

Aus dem Institut und der Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dennis Nowak

Wirkung von Zigarettenrauchextrakt und Wasserstoffperoxid auf das Wachstumsverhalten menschlicher Lungenfibroblasten

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sabine Schindler

aus Stuttgart

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Nowak

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Harald Mückter

Prof. Dr. Jürgen Behr

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. nat. R.A. Jörres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2015

Für R.B.

Inhaltsverzeichnis

1.	Hintergrund der Untersuchung	1
1.1.	COPD	1
1.1.1	Charakteristika der COPD	1
1.1.2	Faktoren für die Entstehung einer COPD	2
1.1.3.	Chronisch-obstruktive Bronchitis	3
1.1.4.	Lungenemphysem	4
1.2.	COPD und Lungenfibroblasten	6
1.3	Seneszenz als Faktor des Emphysems	6
2.	Rauchen als zentrale Ursache der COPD	10
3.	Fragestellung	12
4.	Methoden	14
4.1.	Allgemeines zu den Methoden	14
4.1.1.	Ansetzen des Kulturmediums	14
4.1.2 .	Auftauen der Reagenzien	14
4.1.3.	Arbeiten mit Zellkulturen	14
4.2.	Zellkultur	15
4.2.1.	Anzucht der Zellen aus Gewebeproben	15
4.2.2.	Arbeitsschema der TC25-Flaschen	16
4. 3.	Weiterverarbeitung der Zellen	16
4.3.1.	Trypsinisieren von Zellen aus TC25-Flaschen	16
4.3.2.	Zählen der Zellen	17
4.3.3.	Ansetzen der Wachstumsversuche	17

4.3.4.	Einfrieren	17
4.3.5.	Weiterkultivierung	18
4.4.	Herstellung des Zigarettenrauchextraktes	18
4.4.1.	Abrauchen der Zigaretten	18
4.4.2.	Weiterverarbeiten des Zigarettenrauchextraktes	19
4.4.3.	Bestimmung der Nikotinkonzentration im Zigarettenrauchextrakt	19
4.5.	Wachstumsversuche	20
4.5.1.	Wachstumsversuch in einer TC24-Well-Platte	20
4.5.2.	Trypsinisierung einer TC24-Well-Platte	20
4.5.3.	Zellzählung einer TC24-Well-Platte	20
4.6.	Exposition der Zellen gegenüber Zigarettenrauchextrakt	21
4.6.1.	Wachstumsversuch in einer TC24-Well Platte mit Zigarettenrauchextrakt	21
4.6.2.	Prozentuale Verdünnung des Zigarettenrauchextraktes	21
4.6.3.	Waschen der Wells zur Beendigung der Exposition	21
4.7.	Überprüfen der zellulären Alterung mittels β -Galaktosidase-Anfärbung	22
4.7.1.	Fixieren der β -Galaktosidase-positiven Zellen	22
4.7.2.	Anfärben und Zählen der β -Galaktosidase-positiven Zellen	23
4.7.3.	Überprüfen der Seneszenz mittels Natriumbutyrat	24
4.8.	Gewebebegewinnung und Zellkultur	24
4.8.1.	Gewebebegewinnung	24
4.8.2.	Zellkultur	25
4.9.	Datenauswertung	26

5.	Ergebnisse	27
5.1.	Vorversuche und Erfahrungen mit der Zellkultur	27
5.1.1.	Vorversuche mit Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	28
5.1.2.	Vorversuche mit Zigarettenrauchextrakt (CSE)	28
5.2.	Ergebnisse der Hauptversuche	29
5.2.1.	Versuche mit Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	29
5.2.2.	Versuche mit Zigarettenrauchextrakt (CSE)	31
5.2.2.1.	Dauerhafte Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt (CSE)	31
5.2.2.2.	Temporäre Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt (CSE)	36
5.3.	Überprüfung der Seneszenz mittels β -Galaktosidase-Anfärbung	39
5.3.1.	Versuche mit Natriumbutyrat	39
5.3.2.	Effekt von Zigarettenrauchextrakt (CSE)	40
6.	Diskussion	41
6.1.	Bedingungen der Zellkultur und Auswertung der Zellen	43
6.2.	Wirkung von Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	45
6.3.	Wirkung einer dauerhaften Zigarettenrauchexposition (CSE)	46
6.4.	Wirkung einer temporären Zigarettenrauchexposition (CSE)	47
6.5.	Einflüsse auf die Vitalität	49
6.6.	Seneszenzmarker	49
6.7.	Limitation der Versuche	50
6.8.	Schlussfolgerung	54
6.9.	Ausblick auf weiterführende Experimente	55

7.	Zusammenfassung	57
8.	Diagramme	60
8.1	Wachstumsdiagramme	61
8.2.	Diagramme einer dauerhaften Exposition mit H ₂ O ₂	64
8.2.1	10 µM H ₂ O ₂	64
8.2.2.	50 µM H ₂ O ₂	66
8.2.3.	66 µM H ₂ O ₂	71
8.2.4.	100 µM H ₂ O ₂	73
8.2.5.	200 µM H ₂ O ₂	75
8.3.	Diagramme einer temporären Exposition mit H ₂ O ₂	77
8.3.1.	50 µM H ₂ O ₂	77
8.3.2.	100 µM H ₂ O ₂	81
8.4.	Diagramme mit CSE in PBS	85
8.4.1.	1% CSE	85
8.4.2	2% CSE	88
8.4.3.	5% CSE	90
8.4.4.	10% CSE	91
8.5.	Diagramme einer dauerhaften Exposition mit CSE in D-MEM	92
8.5.1.	1% CSE	92
8.5.2.	2% CSE	94
8.5.3.	5% CSE	96
8.6.	Diagramme einer temporären Exposition mit 5% CSE in D-MEM	100
8.7.	Diagramme mit Natriumbutyrat	108
8.8.	Diagramme mit β-Galaktosidase Färbung bei 5 % CSE	110

9.	Literaturverzeichnis	119
10.	Abbildungsverzeichnis	125
11.	Abkürzungsverzeichnis	127
	Anhang	129
A.1.	Danksagung	129
A.2.	Eigenständigkeitserklärung	130

1. Hintergrund

1.1 COPD

1.1.1 Charakteristika der COPD

Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) ist eine verbreitete respiratorische Erkrankung. Sie wird charakterisiert als „Krankheitszustand, der durch eine Limitierung des Luftstroms (durch die Atemwege) gekennzeichnet ist, die nicht vollständig reversibel ist. Diese Luftstromlimitierung ist normalerweise progressiv und mit einer veränderten entzündlichen Antwort der Lunge auf toxische Partikel oder Gase assoziiert“ (übersetzt nach Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease [GOLD 2013]). Als Symptome treten Husten mit Auswurf sowie Atemnot bei Belastung auf, welche in fortgeschrittenem Stadium auch in Ruhe besteht.

Derzeit wird geschätzt, dass im Jahr 2004 etwa 63,6 Millionen Menschen an einer COPD erkrankt sind [WHO: The global burden of disease, update 2004]. Die WHO stuft die COPD inzwischen als die vierthäufigste Todesursache ein und vermutet, dass im Jahre 2011 etwa 2,96 Millionen Menschen weltweit daran verstarben [WHO: The global burden of disease, 2013]. Momentan nimmt die COPD den 12. Platz in der Statistik der weltweit das Gesundheitssystem belastenden Krankheiten ein. Man geht aber davon aus, dass sie bis zum Jahr 2030 auf Platz 3 vorrückt und damit etwa 8,6 % aller Todesfälle ausmachen wird [WHO 2013]. Zudem wird erwartet, dass entsprechend auch die Prävalenz weiter zunehmen wird [z.B. Calverley & Walker 2003, Pauwels & Rabe 2004, Nowak et al. 2005]. Offenbar haben dabei Frauen ein höheres Risiko, an einer COPD zu erkranken, als Männer [Gold et al. 1996]. Da viele Patienten erst in fortgeschrittenem Stadium einen Arzt konsultieren und die Symptome nicht immer gleich korrekt interpretiert werden, geht man von einer hohen Dunkelziffer von an einer COPD erkrankten Patienten aus. Aufgrund dieser Faktoren ist das klinische und pathophysiologische Interesse an der COPD in den letzten Jahren stetig gestiegen; die neu gewonnenen Erkenntnisse spiegeln sich auch in einem Wandel der Einschätzung therapeutischer Optionen und Perspektiven wieder [Celli 2006].

Unter dem Begriff COPD werden zwei Hauptphänotypen zusammengefasst, die allerdings selten in isolierter Form vorkommen, die chronisch-obstruktive Bronchitis und das Lungenemphysem. Diese treten meist gemeinsam auf, die Quantifikation der jeweils wechselnden Anteile ist allerdings bislang noch nicht für die klinische Praxis befriedigend gelöst, da sie im Allgemeinen aufwendige Verfahren erfordert und/oder eine Strahlenbelastung durch eine Computertomographie beinhaltet.

Die Kategorisierung und Phänotypisierung der COPD unterliegt derzeit immer wieder Änderungen, da inzwischen beispielsweise auch die Exazerbationshäufigkeit als wichtiger Prädiktor des Verlaufs einbezogen wird [z. B. GOLD 2013, Miravitlles et al. 2013]. Von zentraler klinischer Bedeutung sind die vielen Komorbiditäten [z.B. García-Olmos et al. 2013], deren Muster und Risikoprofil inzwischen sogar zum Begriff des „Komorbidoms“ geführt hat [Fabbri et al. 2012, Decramer et al. 2012]. Als vermittelnder Faktor wird häufig eine systemische Entzündung angenommen [z.B. Barnes & Celli 2009], allerdings ist deren ursächliche Rolle umstritten. Bemerkenswert ist, dass sich auch bei einer Reihe dieser Komorbiditäten, vor allem denen kardiovaskulärer Art, Beziehungen zu Prozessen vorzeitiger Alterung herstellen lassen.

1.1.2 Faktoren für die Entstehung einer COPD

In den Industrieländern ist Zigarettenrauch der Hauptrisikofaktor, an einer COPD zu erkranken; dieser ist laut verschiedenen Studien für etwa 80-90 % der Erkrankungen verantwortlich [Snider 1989, Bartal 2005, GOLD 2013]. Dabei nimmt das Risiko, an einer COPD zu erkranken, mit der Dauer und Intensität des Rauchens zu [Fletcher & Peto 1977, Snider 1989]. Bemerkenswert bleibt allerdings, dass nur etwa 10 – 20 % der Raucher eine Atemwegsobstruktion entwickeln, die sich als lungenfunktionsanalytisch und klinisch relevant bezeichnen lässt [z.B. Fletcher & Peto 1977]. Die zugrundeliegenden protektiven Faktoren sind weitgehend unbekannt und Gegenstand aktueller Forschung.

In geringerem Maße ist auch die Inhalation von Gasen am Arbeitsplatz ein Risikofaktor für die Entstehung einer COPD. Dabei spielen vor allem chemische Dämpfe wie z.B. Lösungsmitteldämpfe und Gase wie z.B. Ammoniak, Nitrose Gase, Isocyanate und Chlorgasverbindungen eine große Rolle. Aber auch die Inhalation von Industrie- oder Metallstäuben erhöht das Risiko. Da in den Industriestaaten

strenge Richtlinien bestehen, um die Beschäftigten z.B. in der Papier- und Textilindustrie, im Bergbau und im Baugewerbe zu schützen, stellen diese Noxen vor allem in den Entwicklungsländern eine Gefahr dar. Es gibt Schätzungen, dass die Exposition gegenüber nur einer Noxe am Arbeitsplatz das Risiko, an einer COPD zu erkranken, bereits auf 15 % erhöht [American Thoracic Society 2002]. Wie in verschiedenen Studien nachgewiesen wurde, kann auch die Verbrennung von fossilen Brennstoffen und die damit verbundene Luftverschmutzung zu einer Erkrankung der Atemwegsorgane beitragen [z.B. American Thoracic Society 2000]. Es ist jedoch bislang noch nicht bekannt, inwieweit diese ursächlich und nicht nur begünstigend im Zusammenhang mit der Entstehung einer COPD stehen. Es gibt zudem Belege dafür, dass auch ein niedriges Bildungsniveau und damit meist auch niedrigeres Einkommen mit einem erhöhten Risiko, an einer COPD zu erkranken, verbunden ist. Dieses Risiko scheint unabhängig vom jeweiligen Rauchverhalten [Prescott et al. 1999] und ist vermutlich an allgemeine Lebensstilfaktoren gekoppelt.

1.1.3 Chronisch-obstruktive Bronchitis

Die chronische Bronchitis ist nach der Definition der WHO dann anzunehmen, wenn bei einem Patienten in zwei aufeinander folgenden Jahren in mindestens drei aufeinanderfolgenden Monaten ein produktiver Husten besteht, der keine anderen Ursachen hat [WHO 1961]. Sie ist die am häufigsten verbreitete bzw. klinisch auffälligste Form der COPD. Eine chronisch-obstruktive Bronchitis besteht, wenn die Obstruktion auch unter optimaler antiobstruktiver Therapie nicht vollständig behoben werden kann. Die Patienten klagen über gehäuft am Morgen auftretenden produktiven Husten, häufige Atemwegsinfektionen durch Infektexazerbation und eine in Schüben verlaufende Progression der Beschwerden.

Kennzeichnend für die chronisch-obstruktive Bronchitis ist eine chronische Entzündung der Bronchiolen und des Lungenparenchyms. Besonders involviert in diesen entzündlichen Prozeß sind Neutrophile, Makrophagen und CD8-positive T-Lymphozyten [Barnes & Hansel 2004]. Die Entzündung findet sich vor allem im Epithel der zentralen Luftwege und in den schleimproduzierenden Drüsenzellen. Damit gehen eine gesteigerte Schleimproduktion, eine Verminderung des Zilienschlages und eine erhöhte Permeabilität des Epithels einher [MacNee 2005]. Diese Faktoren führen in fortgeschrittenen Stadien zu einer erheblichen Behinderung

des Gasaustausches in der Lunge mit nachfolgender Hypoxie und Hyperkapnie, welche zu einer Zyanose der Haut führen und dadurch sichtbar werden. In frühen Stadien der COPD spielt die Schleimproduktion noch eine untergeordnete Rolle. In späteren Stadien trägt eine Erhöhung dieser Schleimproduktion dann zum Risiko der Exazerbation bei. Diese chronische Schleimproduktion könnte u.a. eine Reaktion auf die chronische Entzündung der Submucosa sein [MacNee 2005]. Entsprechend dem relativ unspezifischen Entzündungsprozess finden sich Änderungen in vielen Markern der Entzündung wie Zytokinen; allerdings ist der klinische Nutzen bzw. die Zusatzinformation unter den Bedingungen der klinischen Praxis derzeit noch unklar.

Durch Ausschalten der Noxen und intensive Patientenschulung ist die nichtobstruktive Form der chronischen Bronchitis häufig noch, zumindest teilweise, reversibel. Liegt bereits eine Obstruktion vor, führen eine Therapie mit Sekretolytika, kurz- oder langwirksamen Beta-2-Adrenozeptor-Agonisten und Anticholinergika, systemischen und/oder inhalativen Corticosteroiden, Atemgymnastik, eine aktive Immunisierung gegen Pneumokokken und in schweren Fällen eine Sauerstoff-Langzeittherapie und/oder eine nichtinvasive Beatmung zur Besserung der Beschwerden.

1.1.4 Lungenemphysem

Bei einem Emphysem handelt es sich um eine irreversible Erweiterung der Lufträume distal der Bronchioli terminales. Diese wird nach gängiger Meinung durch chronisch-entzündliche Prozesse hervorgerufen, wie sie auch für die Entstehung der chronisch-obstruktiven Bronchitis verantwortlich sind. Beim Lungenemphysem führen sie über eine Destruktion des Parenchyms zu einer Destruktion der Alveolarsepten. Die elastische Rückstellkraft der Lunge führt normalerweise dazu, dass bei der Ausatmung die Bronchien weitgehend offen bleiben und die Luft wieder aus der Lunge entlassen wird. Durch die Verminderung der Elastizität und einen expiratorischen Kollaps der Atemwege verringert sich der (maximale) expiratorische Luftstrom [MacNee 2005].

Man unterscheidet ein centriacinäres (centrilobuläres), panacinäres (panlobuläres) und bullöses (großbullöses) Emphysem voneinander [z.B. West 1987, MacNee 2005]. Beim centriacinären Emphysem treten die meisten Schäden im Bereich der respiratorischen Bronchioli auf. Hier bilden sich die typischen Luftpölster proximal der

Alveolen. Dieser Emphysemtyp ist am engsten mit dem Rauchen von Tabak assoziiert [MacNee 2005]. Diese Form des Emphysems findet sich häufig homogen über die Lunge verteilt. Dabei gibt es nur geringfügige Unterschiede der Ausprägung zwischen den einzelnen Herden. Die alveolären Wände können beim centriacinären Emphysem sowohl dünner als auch fibrotisch verdickt sein [Nagai & Thurlbeck 1991], was eine Abgrenzung gegenüber den anderen Formen oft schwierig macht. Das panacinäre Emphysem ist gehäuft im Apex des Unterlappens zu finden und kann sich von dort aus in weitere Bereiche des Unterlappens ausbreiten. Kennzeichnend für diese Form sind eine Erweiterung und Zerstörung des kompletten Acinus. Dabei kann die alveoläre Septierung verloren gehen. Dies erklärt, warum diese Form des Emphysems zu einer stärkeren Störung der Lungenelastizität und des Gasaustausches führt, als die centriacinäre Form. Diese Form des Emphysems ist normalerweise mit einem α -1-Antitrypsinmangel assoziiert [MacNee 2005]. Kommt es zu einer weiteren Einschmelzung weiter proximal gelegener Atemwege, können sich große dünnwandige Blasen bilden. Diese Form des Emphysems wird dann als bullös bzw. großbullös bezeichnet. Da die Blasen eine erhebliche Größe annehmen können, sind sie sonographisch und auskultatorisch gut zu erkennen. Durch die Blasenbildung wird die zum Gasaustausch zur Verfügung stehende Oberfläche reduziert, und es kann schon bei geringen Anstrengungen zu einer Hypoxie und Hyperkapnie kommen. Diese Emphysemlasen können chirurgisch entfernt werden.

Häufige Folgeerkrankungen des Lungenemphysems sind eine pulmonale Hypertonie sowie ein Cor pulmonale. Da es keine spezielle effektive Therapie gibt, ist es in erster Linie wichtig, die auslösende Noxe zu meiden. Die derzeit verfügbare bzw. rational begründbare Behandlung ist praktisch nicht von derjenigen der chronisch-obstruktiven Bronchitis zu unterscheiden, zumal beide Formen in der Regel gemeinsam vorkommen. Im Spätstadium der Erkrankung können die Beschwerden durch mechanische Maßnahmen, z. B. eine nichtinvasive Beatmung, verbessert werden [z.B. Budweiser et al. 2006a]. Da es sich bei einem Emphysem nach gegenwärtigem Wissensstand um eine irreversible Zerstörung der Alveolen handelt, hat die Erkrankung eine schlechtere Prognose als die chronische Bronchitis.

Das Lungenemphysem hat eine geschätzte Prävalenz unter der Gesamtbevölkerung von etwa 0,5 bis 5,7 % [Halbert et al. 2006]. Bei Obduktionen aus unterschiedlichen Gründen zeigten jedoch etwa 20 – 50 % der Obduzierten – wenn auch nur leichtgradig - morphologische Anzeichen für ein Lungenemphysem [Jinno et al.

1994]. Dabei ist zu beobachten, dass ein Lungenemphysem gehäuft im Alter und bei Männern zu finden ist [Anderson et al. 1972, Cockcroft et al. 1982, Dodge et al. 1986]. In welchem Umfang eine chronische bzw. chronisch-obstruktive Bronchitis notwendigerweise in ein Emphysem übergeht, ist derzeit unklar und wird mittels avancierter radiologischer Analysen untersucht [z.B. Galbán et al. 2012].

1.2. COPD und Lungenfibroblasten

Lungenfibroblasten sind der häufigste Zelltyp des Interstitiums [Weibel et al. 1976]. Sie produzieren einerseits extrazelluläre Matrixproteine und leisten andererseits strukturelle Unterstützung. Daher nehmen sie - neben Epithel- und Endothelzellen - eine wichtige Rolle unter den Lungenstrukturzellen ein [Absher 1995]. Werden in der Lunge Strukturzellen geschädigt oder durch Stimuli zur Apoptose gebracht, kommt es je nach Ausmaß und Chronizität der Vorgänge zu einer Veränderung der Lungenstruktur. Diese zieht, soweit möglich, in der Regel eine Reparatur nach sich [Kasahara et al. 2001, Aoshiba et al. 2003b, Tudor et al. 2003].

Aufgrund der exponierten Lage der alveolären Strukturzellen, sind diese in besonderem Maße externen Einflüssen ausgesetzt und müssen somit in der Lage sein, auf verschiedene Stressoren zu reagieren und entstandene Schäden schnell und möglichst vollständig zu reparieren. Dafür scheint ein fortwährender Zellersatz über die Lebenszeit erforderlich. Werden allerdings die Teilungseigenschaften ortsständiger Zellen gestört und leisten diese den Hauptanteil des Ersatzes, so ist dieser Zellersatz nicht mehr möglich, und es kommt in der Folge zu irreversiblen Änderungen der Lungenstruktur. Untersuchungen von Zellen in Kultur gaben Hinweise auf Unterschiede des zellulären Phänotyps zwischen Fibroblasten von Patienten mit Lungenemphysem und von gesunden Kontrollpatienten.

1.3 Seneszenz als Faktor des Emphysems

Ein auffälliges Phänomen bei Rauchern stellt das Auftreten von Zeichen einer vorgezogenen Alterung dar, was insbesondere für die Haut gezeigt wurde [Freiman et al. 2004]. Dabei überlagern sich diese Effekte mit denen der natürlichen Alterung. Man kann allerdings davon ausgehen, dass 20 Packyears eine Alterung hervorrufen, die etwa 10 Jahre natürlichen Alterns entsprechen [Leung & Harvey 2002]. Unter den

Eigenschaften gealterter Zellen sticht die Reduktion der Teilungsbereitschaft besonders hervor, die zur Einstellung sämtlicher Proliferation in Kultur führen kann [Hayflick & Moorhead 1961, Hayflick 1965]. Auch bei der normalen Alterung kommt es zu mehr oder weniger ausgeprägten Strukturänderungen der Lunge, die einem Lungenemphysem ähneln („Altersemphysem“) [Janssens et al. 1999] und mit einer Rarefizierung von Alveolen verbunden sind. Die alveolären Gänge werden weiter, und eine irreguläre Verteilung der elastischen Fasern tritt auf [Verbeken et al. 1992]. Zudem ist bemerkenswert, dass eine kalorische Restriktion („Hungern“) bei Nagern zu einer Reduktion der zellulären Teilungsbereitschaft führt, zeitgleich aber auch zu einem Abbau von Lungenstruktur ähnlich einem Emphysem [Massaro et al. 2002 und 2004b]. Dies ist unter dem Gesichtspunkt der beim Emphysem nicht seltenen Kachexie von Interesse.

Aufbauend auf diesen Beobachtungen lässt sich als Hypothese zur Entstehung des Emphysems formulieren, dass es unter anderem auch auf intrinsischen Unterschieden im Teilungs- und somit Zellersatzverhalten von Lungenstrukturzellen, beispielsweise Fibroblasten, zwischen Gesunden und Patienten mit Emphysem beruht. Dieser Unterschied könnte die Charakteristika einer zellulären Seneszenz annehmen und als irreversible Änderung auch den ab einem gewissen Stadium gewissermaßen autonomen Progress der Erkrankung teilweise erklären. Gemäß dieser Hypothese würden die Veränderungen des Zellverhaltens nicht so sehr akut vom lokalen entzündlichen Prozess hervorgerufen, sondern stellten persistierende Charakteristika dar. Demzufolge sollten sie auch unter standardisierten Bedingungen in Kultur, d.h. in Abwesenheit entzündlicher Faktoren, reproduzierbar sein.

In der Tat fand sich bei ersten diesbezüglichen Untersuchungen von Lungenstrukturzellen, dass in einer Kultur mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) Lungenfibroblasten von Patienten mit Lungenemphysem im Vergleich zu Fibroblasten von Lungengesunden eine signifikant verminderte Proliferationsrate aufwiesen [Holz et al. 2004]. Hinzu kam, dass in der Langzeitkultur die proliferative Reserve der Zellen beim Emphysem erniedrigt war, ohne dass dabei die Überlebenszeit der Zellen generell verkürzt war. Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei Langzeitkulturen mit 1 % FCS. Bei beiden Untersuchungsgruppen war die Vitalität der Lungenfibroblasten ähnlich, und die Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand, als Marker der Zellschädigung, lag bei vergleichbaren Werten [Holz et al. 2004]. Die Unterschiede konnten nicht durch eine vermehrte Apoptose

beim Emphysem erklärt werden. In ähnlicher Weise fanden sich Unterschiede der Proliferationsrate sowie der Anfärbung für die seneszenzassoziierte β -Galaktosidase bei pulmonalen Endothelzellen von Patienten mit COPD [Amsellem et al. 2011]. In dieser Arbeit fanden sich auch Assoziationen mit der Telomerenlänge, Telomeraseaktivität, Zytokinproduktion sowie Expression zellzyklusregulierender Proteine wie p16, p21 und p53.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Zellen von Patienten mit Emphysem und Kontrollpatienten ohne Emphysem mit gleicher Rauchanamnese sich intrinsisch voneinander unterscheiden und vermutlich auch unterschiedlich auf die Stimulation mit Wachstumsfaktoren reagieren. Daraus resultiert dann das unterschiedliche Proliferationsverhalten. Diese Beobachtungen sind mit der Hypothese einer zellulären Seneszenz in vollem Umfang vereinbar.

Untersuchungen zur Antwort von Zellen auf Wachstumsfaktoren bestätigten diese Überlegungen. Bei der Gabe von IL-1 β zeigten Zellen von Patienten mit Emphysem gegenüber denen von Kontrollpatienten eine geringere Antwort, jedoch eine stärkere Antwort bei Gabe von TGF- β 1 [Noordhoek et al. 2003]. Analoge Versuche erfolgten an Lungenfibroblasten mit Insulin, IGF-1 und IGF-2. Interessanterweise antworteten die Zellen der Patienten mit Emphysem im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit einer geringfügigen, jedoch statistisch signifikanten Steigerung der Proliferationsrate [Müller et al. 2006a].

Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem signifikant stärker für die seneszenzassoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal) anfärbten als die der Kontrollgruppe. Allerdings fanden sich in dieser Studie bei kultivierten Zellen keine Unterschiede in der Länge der Telomeren, einem chromosomalen Alterungsmarker [Müller et al. 2006b]. Andererseits wurde inzwischen gezeigt, dass die Telomerenlänge von Leukozyten des peripheren Bluts bei Patienten mit COPD gegenüber altersgleichen Kontrollpersonen verkürzt ist [Savale et al. 2009], in Übereinstimmung mit der Annahme einer vorzeitigen Alterung.

Zusammengenommen legen diese Daten die Hypothese nahe, dass beim Lungenemphysem Strukturzellen der Lunge, darunter auch parenchymale Lungenfibroblasten, intrinsisch verändert sind und dass diese Änderungen im Sinne eines zellulären Alterns zu interpretieren sind. Die Inkonsistenzen zwischen den Daten sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass es sich um eine induzierte

Alterung handelt, d.h. eine durch externe Einflüsse hervorgerufene, im Gegensatz zu einer endogenen, Alterung. Eine induzierte Alterung kann auf vielfache Weise hervorgerufen werden und zeigt dementsprechend ein komplexes Bild der Veränderung des zellulären Verhaltens inklusive der Proliferation [Famulski & Halloran 2005]. Zum anderen könnten in Zellkultur Selektionseffekte auftreten, welche das Ergebnis beeinflussen. In Übereinstimmung mit der Annahme einer verminderten Regenerationskapazität fand sich, dass endotheliale Progenitorzellen bei Rauchern und Patienten mit COPD beeinträchtigt waren [Paschalaki et al. 2013]. Dies wurde bereits für kardiale Erkrankungen gezeigt [Sato et al. 2008] und äußerte sich in einem Zusammenhang zwischen der Telomerenlänge der Progenitorzellen und dem Ausmaß oxidativer DNA-Schädigung.

Auf der Basis dieser und weiterer Beobachtungen wird inzwischen von einer Reihe von Autoren die Hypothese vertreten, dass zelluläre Alterung einen wesentlichen Faktor bei der Entstehung einer COPD darstellt [z.B. Karrasch et al. 2008, Ito & Barnes & Celli 2009, MacNee 2009, Chilosi et al. 2013, Bartling 2013] ungeachtet der Tatsache, dass auch physiologische und molekulare Unterschiede zur Alterung bestehen [Fukuchi 2009].

2. Rauchen als zentrale Ursache der COPD

Neben Noxen am Arbeitsplatz und der Umwelt ist Rauchen in den Industrieländern nach wie vor der zentrale Risikofaktor für die Entstehung einer COPD [GOLD 2013, Bartal 2005]. Auch in den Ländern der Dritten Welt, in denen bislang Umweltnoxen als wesentlicher Risikofaktor für COPD galten, rückt das Zigarettenrauchen als auslösende Noxe mehr und mehr in den Vordergrund.

Aufgrund der Vielzahl aggressiver chemischer Substanzen und freier Radikale im Zigarettenrauch verwundert es im Prinzip nicht, dass Rauchen eine respiratorische Erkrankung hervorrufen kann [Rodgman et al. 2000], eher im Gegenteil, dass derartige Erkrankungen nicht in jedem Fall auftreten. Oxidanzien können als Faktoren zellulärer Alterung wirken und damit eine typische Veränderung im Verhalten der Zellen hervorrufen [Balaban et al. 2005]. Oxidanzien befinden sich zum einen im Zigarettenrauch und werden zum anderen von den Entzündungszellen in der Reaktion auf das Rauchen erzeugt. Somit könnten Oxidanzien über eine dauerhafte Veränderung der zellulären Eigenschaften auch das ab einem bestimmten Schweregrad weitgehend autonome Fortschreiten der Erkrankung erklären. Die klinische Erfahrung zeigt, dass die Beendigung des Rauchens rechtzeitig erfolgen muss. Ist die Erkrankung erst einmal fortgeschritten, kommt es meist auch ohne weitere inhalative Belastung zu einem Fortschreiten der Krankheit.

Neben der möglichen zellulären Seneszenz ist vermutlich ein weiterer Faktor, dass der strukturelle Umbau der Lunge und Atemwege die Entzündung unterstützt bzw. unterhält, beispielsweise durch Mukushypersekretion und behinderten Mukustransport, Hypoxie, sowie eine Reizwirkung, die zur Freisetzung von Radikalen und Entzündungsmediatoren und zur Einwanderung von Entzündungszellen führt [Pauwels & Rabe 2004, Di Stefano et al. 2004]. Hierdurch würde auch der bislang relativ geringe Erfolg primär gegen die Entzündung gerichteter Medikamente bei der COPD erklärt.

Ungeachtet aller Fortschritte in der Erkenntnis der Pathomechanismen der COPD besteht die nach wie vor effektivste Therapie der COPD darin, mit dem Rauchen aufzuhören [Fletcher & Peto 1977, Anthonisen et al. 2002, Anzueto 2006]. Mit dem Ende des Zigarettenkonsums kommt es im Allgemeinen zu einer Besserung der Symptomatik und einer Normalisierung der altersabhängigen Lungenfunktions-

änderung, die sich bei Rauchern in einem gegenüber Nichtrauchern gesteigerten altersassoziierten Abfall äußert [Fletcher & Peto 1977, Anthonisen et al. 2002, Anzueto 2006]. Zudem reduziert sich die bei Rauchern beobachtete Atemwegs-überempfindlichkeit, die einen zusätzlichen Risikofaktor darstellt [Willemse et al. 2004]. Allerdings fand sich zugleich nach Beendigung des Rauchens eine (zumindest temporäre) Zunahme der Zahl neutrophiler Granulozyten im Sputum, ebenso eine Persistenz der Atemwegsentzündung in der bronchialen Mukosa [Willemse et al. 2004 und 2005].

Die Lungenfunktion von ehemaligen Rauchern lässt darauf schließen, dass sich die über die Jahre angesammelten morphologischen Veränderungen der Lunge nach Beendigung des Rauchens nicht spontan rückbilden. Bei Nagern ist die spontane Restitution von alveolären Strukturverlusten mehrfach beschrieben, sofern diese durch Hungern hervorgerufen wurden [Massaro et al. 2002]. Beim Menschen gemachte Beobachtungen weisen allerdings derzeit nicht darauf hin, dass es eine nennenswerte alveoläre Restitutionskapazität beim Erwachsenen gibt. Letztere lässt sich nur bei sehr jungen Kindern beobachten, z.B. im Falle einer Lobektomie bei ansonsten gesunder Lunge [Nakajima et al. 1998]. Demzufolge liegen zurzeit keine Anhaltspunkte dafür vor, dass die Zerstörung der alveolären Strukturen, welche das Emphysem charakterisiert, heilbar ist, indem sich nach Beendigung des Rauchens spontan neue Alveolen bilden. Diese Überlegungen deuten an, dass eine eventuelle regenerative Therapie möglicherweise ein Haupthindernis in der zellulären Alterung findet, die beim Emphysem stärker als im Normalfall ausgeprägt ist. Umso wichtiger erscheint es, den Prozess einer solchen Alterung zu verstehen, sowohl *in vivo* als auch durch Experimente an isolierten Zellen.

3. Fragestellung

Es ist ein bekanntes Phänomen, dass Zellen umso langsamer wachsen und sich ihre Proliferationsrate umso mehr verringert, je älter sie werden. Untersuchungen an Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem haben gezeigt, dass diese Zellen unter Kulturbedingungen verglichen mit Zellen von Kontrollpatienten langsamer proliferierten und die maximale Zahl der Zellteilungen geringer war [Holz et al. 2004]. Diese Befunde wiesen im Zusammenhang mit weiteren Daten auf eine zelluläre Seneszenz beim Emphysem hin. Darüber hinaus fanden sich auch im Tierexperiment Zeichen einer zellulären Seneszenz nach Zigarettenrauchexposition [Tsuji et al. 2004]. Ferner weisen Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern gleichen Alters früher Zeichen einer Alterung auf; besonders deutlich ist dies an der Haut zu erkennen.

Die Induktion einer zellulären Seneszenz im Zellkulturexperiment wurde mit den verschiedensten Noxen an verschiedenen Zelltypen aufgezeigt. Aufbauend auf den vorangegangenen Überlegungen stellte sich die vorliegende Arbeit die Frage, ob sich eine derartige Seneszenz in Kultur durch Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt im Vergleich zu unbehandelten Zellen hervorrufen lässt. Daten zur Wirkung von Zigarettenrauchextrakt auf Fibroblasten lagen bereits vor. Das Neuartige in der Konzeption der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine temporäre Exposition durchzuführen und das Augenmerk auf das zelluläre Verhalten nach Beendigung der Exposition zu richten. Hierbei lag der Fokus auf der Proliferationsrate der Zellen, um eine Parallele zu den oben beschriebenen Befunden des Wachstumsverhaltens von Lungenfibroblasten beim Emphysem zu ziehen. Die Analyse des Verhaltens der Zellen nach Wegnahme des Zigarettenrauchs fußte auf der Überlegung, dass ein dauerhaft geändertes zelluläres Verhalten, insbesondere eine induzierte Seneszenz, nur in Abwesenheit von Noxen und entzündlichen Einflüssen einwandfrei identifiziert werden kann.

Als Kontrolle wurde die dauerhafte, sich bis zum Ende der Kultur erstreckende Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt sowie die temporäre Exposition gegenüber Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gewählt. Die Induktion einer zellulären Seneszenz und eines Wachstumsstopps mittels Exposition gegenüber H_2O_2 wurde seit den ersten Untersuchungen dazu [Chen & Ames 1994] vielfach gezeigt. Als zusätzlicher Marker einer zellulären Seneszenz eignet sich die Expression der

seneszenzassoziierten β -Galaktosidase [Dimri et al. 1995], die auch bei Patienten mit Lungenemphysem vermehrt gefunden wurde [z.B. Müller et al. 2006b, Ansellem et al. 2011].

Demzufolge sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden,

- (1) ob die Exposition primärer menschlicher parenchymaler Lungenfibroblasten gegenüber H_2O_2 in diesen Zellen einen bleibenden Wachstumsstopp (Zellarrest) hervorruft,
- (2) welche Effekte eine dauerhafte Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt verschiedener Konzentration auf die Proliferation dieser Zellen ausübt,
- (3) ob eine temporäre Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt die Proliferation dieser Zellen dauerhaft verändert,
- (4) ob sich phänomenologisch Zeichen einer induzierten vorzeitigen zellulären Alterung insbesondere bei temporärer Exposition finden.

Die Klärung dieser Fragen sollte dazu dienen, zum einen herauszufinden, ob sich die beim Emphysem beobachteten langfristigen Veränderungen des Proliferationsverhaltens in einem (notwendigerweise kurzzeitigen) Zellkulturmodell mittels Zigarettenrauch reproduzieren lassen. Die bereits verfügbaren Daten zum H_2O_2 lassen einen solchen Effekt als möglich erscheinen. Zum anderen könnten die Befunde derartiger Experimente dazu beitragen, die Pathomechanismen des Lungenemphysems besser zu verstehen. Lässt sich eine zelluläre Alterung induzieren, sollte dies auch *in vivo* möglich sein, ungeachtet der Frage der relevanten Konzentrationen. Tritt sie nicht auf, deutet dies in Verbindung mit den Befunden an den Zellen der Patienten mit Emphysem eher darauf hin, dass eine langfristige oder wiederholte Exposition, oder ein Zusammenwirken mit anderen Faktoren, beispielsweise Entzündungszellen, für das Auftreten der Seneszenz *in vivo* verantwortlich ist. Auch würde der Befund einer zellulären Seneszenz durch temporäre Gabe von Zigarettenrauch neue Möglichkeiten eröffnen, um die Reversibilität dieses Phänomens zu untersuchen und somit die Entwicklung neuartiger therapeutischer Ansätze bei der COPD zu unterstützen.

4. Methoden

4.1. Allgemeines zu den Methoden

4.1.1. Ansetzen des Kulturmediums

Aus einer 500-mL-Flasche, die Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium enthielt, wurden 50 mL entnommen. In das Medium wurden 50 mL Fötale Rinderserum (E.G. zugelassen, getestet auf Viren und Mycoplasmen), 5 mL Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 Einheiten/mL) und 2,5 mL Gentamicin gegeben. Danach wurde das Medium unter möglicher Vermeidung von Schaumbildung gut gemischt und bei 4-8°C im Kühlschrank gelagert.

4.1.2. Auftauen der Reagenzien

Alle Reagenzien wurden zum Auftauen in ein Wasserbad gegeben, das nicht wärmer als 37°C sein durfte. Alternativ wurde fließendes warmes Wasser verwendet. Danach wurden die einzelnen Substanzen für kurze Zeit bei 37°C in den Brutschrank gestellt, um sie an die Temperatur der Kultur präzise anzupassen.

4.1.3. Arbeiten mit Zellkulturen

Das Arbeiten mit Zellkulturen musste weitestgehend steril unter einer sterilen Werkbank (Lamin Air, Heraeus) erfolgen. Alle Geräte wurden autoklaviert oder bei 200°C für mindestens 1 h (bei 250°C mindestens 0,5 h) hitzebehandelt. Benutzte Einmalgeräte mussten als steril und oder pyrogenfrei ausgezeichnet sein. Die verwendeten Reagenzien mussten für die Zellkultur zugelassen sein oder auch einen entsprechenden Reinheitsgrad wie steril oder pyrogenfrei aufweisen.

Alle Geräte, die unter die Werkbank gebracht wurden, wurden entsprechend gereinigt (autoklaviert oder hitzebehandelt). Oft war auch eine zusätzliche gründliche Säuberung mit Bacillol oder Barrycidal sinnvoll. Die Werkbank lief vor jedem Arbeitsbeginn mindestens eine halbe Stunde, um die Sterilität zu gewährleisten. Vor und nach jedem einzelnen Arbeitsgang wurde die Arbeitsfläche mit Bacillol gesäubert. Wenn es zu Verschmutzungen kam, war diese Reinigung auch während eines Arbeitsganges sinnvoll. Vor jedem Arbeitsgang wurden die Hände gründlich mit

Sterilium gereinigt. Wenn zum Arbeiten Latexhandschuhe verwendet wurden, wurden auch diese mit Sterilium behandelt.

Das Innere des Brutschranks wurde bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5 % gehalten. Der Boden des Brutschranks war mit 3-4 L Sterilwasser befüllt, um eine möglichst hohe Luftfeuchte zu gewährleisten. Das bei der Begasung verwendete CO₂ (Linde AG) hatte einen Reinheitsgrad von mindestens 4.5. Das Medium der Zellen war mit einem pH-Indikator versetzt. Wenn das Medium im Brutschrank die Farbe von rot nach violett wechselte, bedeutete das, dass die Versorgung mit CO₂ nicht ausreichend war und daher der pH nicht adäquat. Umgekehrt bedeutete ein Farbwechsel von rot nach orange, dass die Wachstumsbedingungen eingehalten waren und die Zellen sich teilten.

4.2. Zellkultur

4.2.1. Anzucht der Zellen aus Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden zunächst unter der sterilen Werkbank mit einer geringen Menge Hanks'-Puffer in einer Petrischale gewaschen, um unerwünschte Blutreste zu entfernen. Danach wurde die Probe genau betrachtet und jegliches anderweitige, unerwünschte Gewebe (Pleura, Schwarte, Atemwege, Gefäße) entfernt. Anschließend wurde die Gewebeprobe mit einem Skalpell in möglichst kleine Stücke geteilt und zwischendurch immer wieder mit Hanks'-Puffer gewaschen.

Die kleinen Gewebestücke wurden nun in eine TC25-Flasche überführt und diese mit 3 mL Kulturmedium aufgefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, wenn möglich 10-20 Stückchen pro Flasche einzusetzen. Durch leichtes Schütteln und Bewegen wurden die Stückchen nun möglichst gleichmäßig über den Boden der TC25-Flasche verteilt. Die Flasche wurde dann mit gelockertem Verschluss in den Inkubator (Heraeus BB 6060) gestellt und dort unter Standardbedingungen (37°C, 5 % CO₂) angezüchtet. Für die nächsten 3-4 Tage sollten die Flaschen nun nicht bewegt werden, damit die Zellen in diesen Explantkulturen ungestört auswachsen konnten.

Nach dieser Zeit wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet, um den Wachstumsprozess zu begutachten, und es erfolgte der erste Mediumwechsel. Die aus den Gewebestücken ausgewachsenen Zellen wurden je nach Wachstum nach

etwa 3 Wochen geerntet und die Stückchen als eine weitere Primärkultur ein weiteres Mal mit 3 mL Medium angesetzt.

4.2.2. Arbeitsschema der TC25-Flaschen

Zum Mediumwechsel wurden die Flaschen montags, mittwochs und freitags unter die sterile Werkbank gestellt. Der Deckel wurde entfernt und das Medium mit einer abgeflamnten Pasteur-Pipette und der Absaugpumpe abgesaugt. Danach wurden montags und mittwochs wieder 3 mL Medium zugegeben, sowie freitags, um den Bedarf der Zellen über das Wochenende zu decken, 5 mL. Vor dem Verschließen der Flaschen wurden der Hals und der Deckel abgeflamnt und die Flaschen mit wieder leicht geöffnetem Deckel bei 37°C im Brutschrank weiter kultiviert.

4.3. Weiterverarbeitung der Zellen

4.3.1. Trypsinisieren von Zellen aus TC25-Flaschen

Als Vorbereitung wurde darauf geachtet, dass die sterile Werkbank seit mindestens einer halben Stunde lief, die Absaugpumpe eingeschaltet und die Gasversorgung des Brenners offen und eingeschaltet war. Dann wurde die TC25-Flasche mit verschlossenem Deckel aus dem Brutschrank genommen, unter die Werkbank gestellt und geöffnet. Zum Absaugen des Mediums aus der Flasche wurde eine Pasteur-Pipette abgeflamnt und auf den Pumpenschlauch aufgesetzt.

Nach dem Absaugen des Mediums wurde die Flasche unter leichten Bewegungen mit 1 mL Hanks'-Puffer gespült. Dieser wurde wieder abgesaugt und anschließend einmalig 1 mL Trypsin zugegeben. Für die nun folgende 7-minütige Inkubation wurde der Flaschenhals abgeflamnt und die TC25-Flasche wieder verschlossen. Zwischenzeitliches Bewegen der Flasche und leichtes Aufklopfen auf den Tisch erleichterte es den Fibroblasten, sich vom Flaschenboden zu lösen.

Nach 7 Minuten wurde die Flasche wieder geöffnet und 1 mL Medium zugegeben, um die Wirkung des Trypsins zu stoppen. Danach wurden die Zellen in der TC25-Flasche mit einer 2 mL-Serumpipette mit aufgesetztem Gummisaugball kräftig aufgemischt, vom Flaschenboden abgespült und in ein 15 mL-Sarstedt-Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurde für 8 Minuten bei Raumtemperatur und 612xg zentrifugiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde unter der sterilen Werkbank

geöffnet und das Medium vorsichtig abgesaugt, wobei darauf geachtet wurde, dass das Zell-Pellet nicht versehentlich mit abgesaugt wurde. Je nach Größe des Pellets wurden nun 1-4 mL Medium in das Zentrifugenröhrchen resuspendiert und die Zellen wurden gezählt.

4.3.2. Zählen der Zellen

Aus dem Zentrifugenröhrchen wurde mit einer Pipette 50 μ L entnommen und auf eine Neubauer-Zählkammer (verbesserter Typ, Tiefe 0,100 mm/0,0025 mm²) aufgetragen. Die Anzahl der Zellen pro mL Zellsuspension ergab sich aus der Anzahl der Zellen pro Großquadrat mal 10 000. Wenn sich beim Zählen herausstellte, dass weniger als 100 000 Zellen pro mL vorhanden waren, wurden sie in einer TC25-Flasche weiter kultiviert. Befanden sich mehr als 200 000 Zellen pro mL in dem Zentrifugenröhrchen, gab es mehrere Möglichkeiten, weiter zu verfahren: (a) Weiterkultivierung, (b) Einfrieren der Zellen, (c) Aussäen für Wachstumsversuche in eine TC24-Well-Platte.

4.3.3. Wachstumsversuch

Um eine initiale Zellzahl von 8 000 Zellen pro Well zu erhalten, wurden für eine TC24-Well-Platte 200 000 Zellen in 12,5 mL Medium resuspendiert. Wenn die Zellen erst nach mehr als 48 Stunden gezählt wurden, wurden nur 5 600 Zellen pro Well angesetzt und somit nur 140 000 Zellen auf 12,5 mL Medium benötigt. Danach wurden pro Well 500 μ L dieses Ansatzes eingesät. Beim Pipettieren der Zellen in die einzelnen Wells wurde darauf geachtet, dass die Zellen gut durchmischt wurden, da Fibroblasten dazu neigten, sich rasch auf dem Boden abzusetzen.

4.3.4. Einfrieren

Große Mengen von Zellen, die nicht für die Weiterzucht oder einen Wachstumsversuch benötigt wurden, wurden für die spätere Verwendung eingefroren. Hierzu wurden 2 mL-Kryoröhrchen unter der sterilen Werkbank in einen Kühlblock gesetzt. Die Zellen wurden in die Röhrchen aliquotiert und die Aliquote mit 10 % (v/v) DMSO versetzt. Die Röhrchen wurden sofort in Alufolie und einem wattierten Umschlag bei -30°C eingefroren und nach 24 Stunden bei -80°C

zwischengelagert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen bei ca. -140°C in die Gasphase des Flüssig-Stickstoff gegeben und schließlich direkt in Flüssig-Stickstoff gelagert.

4.3.5. Weiterkultivierung

Zur Weiterkultivierung wurden 3 mL Medium in einer TC25-Flasche vorgelegt und mit 100 000 Zellen gut vermischt. Vor dem Verschluss der Flasche wurden der Hals und der Verschluss abgeflammt und die Zellen im Brutschrank bei 37°C mit wieder leicht geöffnetem Verschluss angezüchtet.

4.4. Herstellung des Zigarettenrauchextraktes

4.4.1. Abrauchen der Zigaretten

Zur Herstellung des den Zigarettenrauch enthaltenden D-MEM wurde jeweils eine Zigarette der Marke „Gauloises blond blau“ mit Filter (nomineller Gehalt Teer 10 mg, Nikotin 0,8 mg) während 5 Minuten unter dem Abzug abgeraucht. Der Hauptstromrauch wurde dabei durch eine Waschflasche (Impinger, DEHA Haan&Wittmer GmbH) mit Fritte, die mit 10 mL D-MEM gefüllt war, geleitet. Zum Abrauchen diente eine automatische Probennahme-Pumpe um standardisierte Soggeschwindigkeiten zu erhalten. Es wurde darauf geachtet, dass das Abrauchen einer Zigarette möglichst genau 5 Minuten in Anspruch nahm, um ein konstantes Verhältnis zwischen dem gesammelten Hauptstrom- und dem verworfenen Nebenstromrauch zu erzielen.

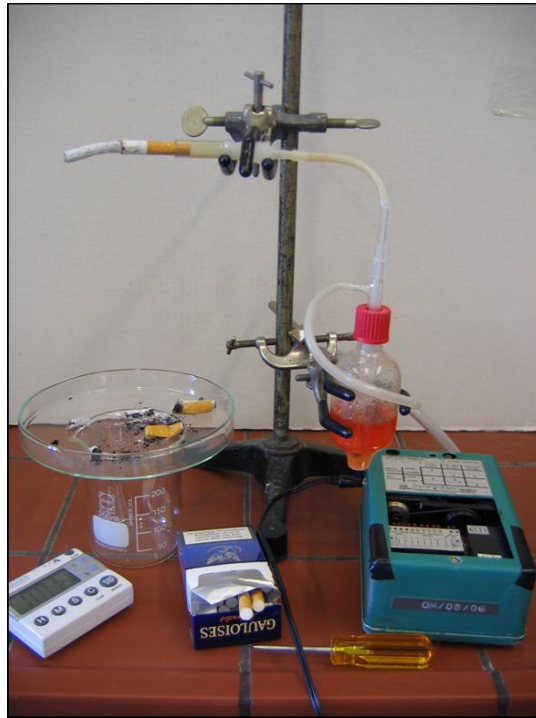


Abbildung 1: Apparatur zum Abrauchen der Zigaretten in D-MEM. Zu sehen sind hier die mit D-MEM gefüllte Waschflasche mit Fritte, die Pumpe und die kurze Schlauchverbindung von der Zigarette zur Flasche.

4.4.2. Weiterverarbeitung des Zigarettenrauchextraktes

Das mit Zigarettenrauch versehene D-MEM-Medium wurde anschließend mit einem 0,2- μ m-Spritzenvorsatzfilter steril filtriert, aliquotiert und dann bei -32°C gelagert. Alle Versuche erfolgten mit frisch aufgetautem Extrakt. Zum einen war die Gewinnung des Extraktes zu aufwendig, um sie für jeden Versuch neu durchzuführen, zum anderen war die Variabilität der einzelnen Proben auf diese Weise geringer.

4.4.3. Bestimmung der Nikotinkonzentration im Zigarettenrauchextrakt

In dem wie beschrieben gewonnenen Zigarettenrauchextrakt wurden die Nikotin-Werte mittels Gaschromatographie gemessen (Labor Dr. Schierl). Diese lagen zwischen 132 und 200 μ g/mL, bei einem Mittel von 168 μ g/mL.

4.5. Wachstumsversuche

4.5.1. Wachstumsversuch in einer TC24-Well-Platte

Der Versuch wurde wie in 4.3.3. beschrieben angesetzt. Nach einer Wachstumszeit von durchschnittlich 48 Stunden wurden die Zellen erstmalig gezählt. Dazu wurden die einzelnen Wells nach einander trypsinisiert und ausgezählt.

4.5.2. Trypsinisierung einer TC24-Well-Platte

Als Vorbereitung wurde darauf geachtet, dass die sterile Werkbank seit mindestens einer halben Stunde lief, die Absaugpumpe eingeschaltet sowie die Gasversorgung des Brenners offen und eingeschaltet war. Die Platte wurde aus dem Brutschrank genommen und unter die Werkbank gestellt. Der Deckel wurde nur so weit geöffnet, wie es für die Bearbeitung der Platte nötig war, und der Rest der Platte mit dem Deckel bedeckt gehalten.

Das Medium wurde aus den Wells mit einer abgeflamten Pasteur-Pipette und der Absaugpumpe angesaugt. Danach wurden die einzelnen Wells mit 500 μL Hanks'-Puffer gespült, wobei die Platte abgedeckt und geschwenkt wurde, um eine effiziente Spülung der Wells zu erreichen. Der Hanks'-Puffer wurde ebenfalls mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt, wobei darauf geachtet wurde, dass beim Wechsel der Wells die Pipette gründlich abgeflammt wurde und zwischen verschiedenen Zellpopulationen eine neue Pipette verwendet wurde.

Sodann wurde je 100 μL Trypsin in die zu zählenden Wells gegeben. Diese wurden dann abgedeckt für 7 Minuten inkubiert, wobei zwischenzeitliches Bewegen der Flasche und leichtes Aufklopfen auf den Tisch es den Fibroblasten erleichterte, sich vom Boden der Wells zu lösen.

4.5.3. Zellzählung einer TC24-Well-Platte

Die trypsinisierten Wells wurden zur Erfassung der Vitalität mit jeweils 100 μL Trypanblau versehen. Die Zellen wurden aus dem Well abgesaugt und in eine Neubauer-Zählkammer (verbesserter Typ, Tiefe 0,100 mm/0,0025 mm²) gegeben. Nun wurden die mit Trypanblau gefärbten bzw. nicht gefärbten Zellen gezählt. Für das Ergebnis wurden drei Auszählungen gemittelt.

4.6. Exposition der Zellen gegenüber Zigarettenrauchextrakt

4.6.1. Wachstumsversuch in einer TC24-Well-Platte mit Zigarettenrauchextrakt

Wie in 4.3.3. beschrieben wurde ein Versuch mit Lungenfibroblasten angesetzt. Nach der ersten Zählung wurden jeweils zwei Wells einer Reihe mit reinem D-MEM versorgt, die anderen zwei wurden mit prozentual verdünntem Zigarettenrauch-Extrakt versorgt. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen erneut trypsinisiert und gezählt (wie in 4.5.3. beschrieben); hierbei konnte der Zeitpunkt in einzelnen Versuchen aus organisatorischen Gründen geringfügig variieren. Je nach gewünschter Dauer der Exposition wurden darauf hin die noch nicht gezählten Wells gewaschen und mit reinem D-MEM versorgt.

4.6.2. Prozentuale Verdünnung des Zigarettenrauchextrakts

Der gewonnene Zigarettenrauchextrakt (wie in 4.4.1. beschrieben) wurde als Ausgangslösung mit einer Konzentration von 100 % festgelegt. Zur Exposition einer TC24-Well-Platte wurde er mit reinem Kulturmedium auf die doppelte Konzentration der für die Exposition festgelegten Endkonzentration verdünnt. Diese lag zwischen 1 und 10 %. Diese Verdünnung wurde auf die Zellen gebracht, und das Medium vermischte sich mit dem sich dort noch befindlichen reinen Kulturmedium zur gewünschten Endkonzentration. Die zur Kontrolle unbehandelten Zellen erhielten analog die gleiche Menge von reinem D-MEM.

4.6.3. Waschen der Wells zur Beendigung des Exposition

Um die Exposition zu beenden, wurden die Wells zwei- bis dreimal vorsichtig gewaschen. Dabei wurde zum Schutz der Zellen jeweils ein Rest von 10 % des Mediums temporär in den Wells belassen. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass nach dem Waschen allenfalls 0,1 – 1 % des Zigarettenrauchextraktes im auf den Zellen verbleibenden Kulturmedium enthalten war.

4.7. Überprüfen der zellulären Alterung mittels β -Galaktosidase-Anfärbung

4.7.1. Fixieren der β -Galaktosidase-positiven Zellen

Zur Verarbeitung wurden auf 16 mm-Kunststoffblättchen, die in die Wells gegeben wurden, die entsprechenden Zellen angezüchtet. Danach wurden die Zellen wie folgt fixiert und die Blättchen nach geeigneter Anfärbung unter dem Mikroskop nach β -Galaktosidase-positiven und -negativen Zellen ausgezählt. Gezählt wurden insgesamt jeweils 700 Zellen.

Verwendet wurde das Senescence β -Galaktosidase Staining Kit der Firma Cell Signaling. Dies beinhaltet 15 mL 10x Fixative Solution; 150 mg X-Gal; 15 mL 10x Staining Solution; 1,5 mL 100x Staining Solution Supplement A: 500 mM potassium ferrocyanide; 1,5 mL 100x Staining Solution Supplement B: 500 mM potassium ferricyanid.

In der Vorbereitung wurden die 10x Staining- und die 10x Fixative Solution mit dest. H₂O auf 1x Lösungen verdünnt. Hierzu wurden 425 μ L 1x Staining Solution und 460 μ L 1x Fixative Solution per 16 mm Well verwandt.

- 46 μ L 10x Fixative Solution + 414 μ L H₂O ergab 460 μ L 1x Fixative Solution.
- 42,5 μ L 10x Staining Solution + 382,5 μ L H₂O ergab 425 μ L 1x Staining Solution.

Für die zu verwendende Staining Solution für ein 16-mm-Well wurden folgende Komponenten gebraucht:

- 425 μ L 1x Staining Solution
- 4,6 μ L Staining Supplement A
- 4,6 μ L Staining Supplement B
- 23 μ L 20mg/ml X-gal in DMF

Das Medium wurde von den Zellen entfernt und jedes Well einmal mit 1 mL 1xPBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 460 μ L 1x Fixative Solution für 10 – 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach dieser Zeit wurde die Fixative Solution von den Zellen entfernt und jedes Well 2-mal mit 1 mL 1xPBS gewaschen. Danach wurden pro Well 460 μ L Staining Solution zugegeben, die Wells leicht geschüttelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für eine längere Lagerung wurde die Staining Solution nach der Inkubation entfernt und die Zellen mit 70 % Glycerin überlagert.

Damit war eine Lagerung der Wells bzw. Plättchen bei 4°C über mehrere Wochen ohne Verfälschung des Ergebnisses möglich.

4.7.2. Anfärben und Zählen der β -Galaktosidase-positiven Zellen

Die Blättchen wurden mit der Pinzette aus dem Well genommen und mit Aqua dest. gespült. Danach wurden Sie zur besseren Erkennung der einzelnen Zellen beim Zählen gegengefärbt. Hierzu wurden sie für 10 Minuten in Hämaun-Lösung nach Mayer gelegt. Nach dieser Zeit wurden sie mit der Pinzette aus der Lösung geholt und so lange mit Aqua dest. gespült, bis keine Farbe mehr abspülbar war. Danach wurde noch einmal kurz unter Leitungswasser gespült. Nach diesem Vorgang wurden die Blättchen dann für 5 Minuten in 0,1-%ige NaCl-Lösung gelegt.

1 Liter der verwendeten Hämaun-Lösung nach Mayer hatte folgende Zusammensetzung:

- | | | |
|-------------------------|----------------------|----------|
| • Hämatoxylin | | 1,0 g |
| • Natriumjodat | | 0,2 g |
| • Aluminiumkaliumsulfat | x12 H ₂ O | 50,0 g |
| • Chloralhydrat | | 50,0 g |
| • Citronensäure | x1 H ₂ O | 1,09 g |
| • Wasser gereinigt | | 1000,0 g |

Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen Aquatex gegeben, das Blättchen darüber gelegt und dann unter dem Mikroskop ausgezählt. β -Galaktosidase-positive Zellen wiesen als Ergebnis der beiden Anfärbungen ein türkisfarbenes Zytoplasma auf, während alle anderen Zellen ausschließlich durch Hämaun gefärbte, rote Zellkerne zeigten.

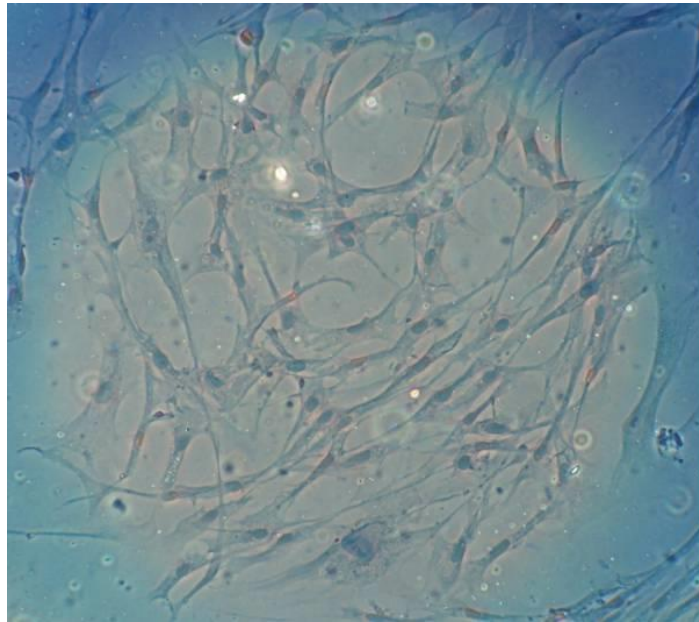


Abbildung 2: Anfärbung der β -Galaktosidase-positiven Zellen mit Hämalaun-Lösung. Die β -Galaktosidase-positiven Zellen sind an ihrem türkisfarbenen Zytoplasma zu erkennen, während alle anderen Zellen lediglich einen durch die Hämalaun-Lösung gefärbten roten Zellkern aufweisen.

4.7.3. Überprüfen der Seneszenz mittels Natriumbutyrat

Zur Überprüfung, ob die Fibroblasten gegen die seneszenzassoziierte β -Galaktosidase positiv werden konnten, wurde der unspezifische Histondeacetylase-Inhibitor Natriumbutyrat (Nr. 19364, Sigma) verwandt, der gemäß Literaturbefunden solche Effekte hervorrufen kann [Ogryzko et al 1996a]. Hierzu wurden die Zellen für 48 Stunden mit 5 mM Natriumbutyrat inkubiert und danach wie oben beschrieben für β -Galaktosidase angefärbt, fixiert und gezählt.

4.8. Gewebegewinnung und Zellkultur

4.8.1. Gewebegewinnung

Die Gewebeproben stammten aus OP-Resektaten, die von der Forschungsabteilung des Krankenhauses Großhansdorf zur Verfügung gestellt wurden. Die Resektate kamen von Patienten, bei denen auf Grund eines Bronchialkarzinoms ein thoraxchirurgischer Eingriff vorgenommen werden musste. Diese Patienten waren vornehmlich Raucher ohne klinisch signifikante COPD oder mit nur gering ausgeprägter COPD. Von den gewonnenen Operationsresektaten wurden nach der Operation seitens eines Pathologen die parenchymalen Proben an den

pleuraseitigen Teilen der Resektate entfernt. Das Einverständnis der Patienten und die Genehmigung der zuständigen Ethikkommission, die Gewebeproben im Rahmen von *in vitro*-Untersuchungen zu verarbeiten, lagen vor.

Nach der Entnahme wurde das Material ca. 15-20 Stunden in D-MEM plus Antibiotikum gelagert und per Kurier verschickt. Durch Beobachtungen wurde festgestellt, dass die Zellen bei Raumtemperatur die höchste Vitalität aufwiesen. Daher wurden die Proben in einer Wärmeisolierung verschickt, um während des Versands die Einwirkung von hohen oder niedrigen Umgebungstemperaturen zu reduzieren. Danach wurde wie in 4.2.1. beschrieben weiter verfahren.

4.8.2. Zellkultur

Vorversuche, in denen mit TC48-Well-Platten gearbeitet wurde, um möglichst viele Wiederholungen und parallele Experimente zu ermöglichen, zeigten sich leider durch Probleme der Reproduzierbarkeit und das Vorkommen von Artefakten aus. Dies betraf vor allem einen deutlichen Unterschied der Ergebnisse der randständigen von denen der zentralen Wells. Aus diesem Grund wurden die Zellen wie in 4.5.1. beschrieben in TC24-Well-Platten ausgesät. Durch eine Belegung der Vertiefungen, die für jede Kondition sowohl ein mittel- als auch ein randständiges Well umfasste, wurde das Auftreten eines möglichen systematischen Fehlers minimiert.

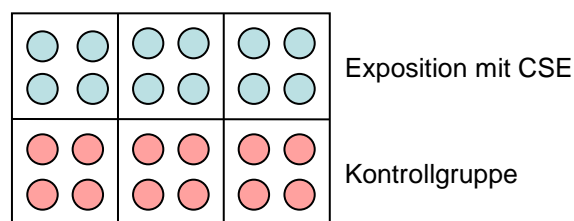


Abbildung 3: Aufteilung der Wells einer TC24-Well-Platte mit jeweils 2 Wells pro Zählung für Zellen mit einer Zigarettenrauchextrakt (CSE) Exposition und Zellen der unbehandelten Kontrollgruppe.

4.9. Datenauswertung

Zur Beschreibung der Messgrößen wurden Mittelwert und Standardfehler (SEM) gewählt. Für die Zuwachsraten von Messzeitpunkt zu Messzeitpunkt wurden mittels logarithmischer Transformation geometrische Mittel und Standardfehler berechnet, um den faktoriellen Änderungen Rechnung zu tragen. Dabei ist der geometrische Standardfehler als dimensionsloser Variabilitätsfaktor des geometrischen Mittelwertes zu verstehen.

Um die verschiedenen Bedingungen statistisch miteinander zu vergleichen, wurden Varianzanalysen herangezogen (ANOVA), die im Allgemeinen im repeated-measures-Design erfolgten. Unterschiede der Kurven wurden hierbei zum einen durch den mittleren Level des Faktors „Exposition“, zum anderen durch den Interaktionsterm „Exposition mal Zeit“ geprüft. Zusätzlich erfolgten nach Bedarf konventionelle t-Tests für verbundene Stichproben; im Ergebnisteil ist die Art des verwendeten Tests jeweils angegeben. Korrelationen wurden mittels Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman quantifiziert.

Die Frage, inwieweit beobachtete Änderungen nach Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt vorübergehenden oder intrinsisch persistierenden Charakter hatten, wurde wie folgt angegangen. Die Zellzahlen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Exposition wurden auf die Zellzahlen bezogen, die entweder bei Beginn oder bei Ende der Exposition beobachtet wurden. Hieraus ergaben sich relative Steigerungsraten. Diese Steigerungsraten wurden dann für jeden Zeitpunkt zwischen Zigarettenrauchexposition und Kontrollexposition mittels t-Test verglichen. Auf diese Weise wurde einerseits das Sistieren der Zellzahl unter Exposition berücksichtigt, welches selbst bei gleicher relativer Zunahme zu einer geringeren absoluten Zunahme der Zellzahl geführt hätte. Zum anderen wurde durch die Wahl gleicher Zeitpunkte berücksichtigt, dass auch unabhängig von der Proliferation zelluläre Alterungsprozesse ablaufen könnten, die zu einer zeitabhängigen Reduktion der Teilungsrate führen könnten. Wenn trotz Bezug auf die jeweilige Ausgangszellzahl und Wahl des gleichen Zeitpunktes ein Unterschied zwischen Zigarettenrauch und Kontrolle nach temporärer Exposition auftrat, wäre dies als ein bleibender, nicht reversibler Effekt zu interpretieren.

Das Niveau des Fehlers erster Art wurde wie üblich auf $p=0,05$ festgelegt. Alle statistischen Analysen erfolgten mit dem Programmpaket STATISTICA für Windows.

5. Ergebnisse

5.1. Vorversuche und Erfahrungen mit der Zellkultur

Die Vorversuche ergaben, dass sich zur Anzucht am besten Zellen der Passagen 1-3 eigneten. In Ausnahmen wurden auch höhere Passagen verwandt, sofern wuchstarke Zellklone vorlagen. Diese Zellen zeigten allerdings vereinzelt bereits eine Abnahme der Proliferationsrate über die Zeit. Für die Experimente wurden Zellen unterschiedlicher Spender verwendet. Je nach Verfügbarkeit und nach Wachstumsverhalten wurden diese jedoch für mehr als ein Experiment verwendet. In jedem Versuch wurden zwei parallele, bezüglich Spender und Exposition identische Ansätze verwandt, deren Ergebnisse später gemittelt wurden.

Für die Versuche wurden vorzugsweise frisch angezogene Zellen verwendet, da kryokonservierte Zellen bei der Anzucht häufig eine Verlangsamung der Proliferation zeigten und im Allgemeinen schwieriger zu untersuchen waren.

Während der Vorversuche stellte sich zudem heraus, dass durch wiederholtes Herausnehmen und Wiedereinstellen der Zellkulturplatten in den Inkubator Störungen im Wachstumsverhalten hervorgerufen wurden. Aus diesem Grund wurden die Versuche so organisiert, dass für jeden geplanten Zähltag eine eigene Platte angesetzt wurde. Sowohl für alle Wells einer Platte als auch für die Anzuchtflaschen herrschten somit die gleichen Wachstumsbedingungen bis zum Zeitpunkt der Auswertung. Auf eine Platte wurde, wenn möglich bis zu drei Spender eingesät und um statistische Variablen zu berücksichtigen jeweils 2 Wells pro Spender.

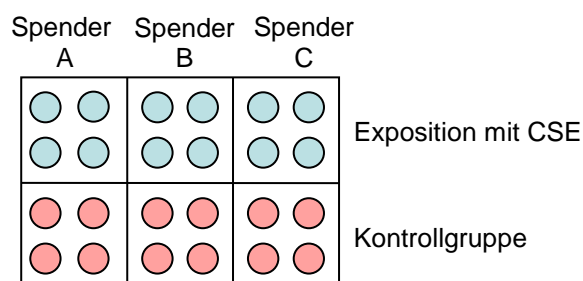


Abbildung 4: Belegung einer TC24-Well-Platte mit Zellen von drei Spendern. Auf diese Weise wurden 7 Platten mit den jeweils drei gleichen Spenderzellen angelegt, um für jeden Zähltag eine Platte bereit zu haben und eine Störung des Wachstumsverhaltens beim wiederholten Herausnehmen der Platten aus dem Brutschrank zu verhindern.

5.1.1 Vorversuche mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Zur Überprüfung der Reaktionsbereitschaft der Lungenfibroblasten erfolgten zunächst Versuche mittels Exposition gegenüber H₂O₂. Hierzu wurde den Zellen H₂O₂ in unterschiedlichen, nicht toxischen Konzentrationen zugeführt. Das H₂O₂ war bei Zugabe in D-MEM gelöst, und die getesteten Konzentrationen rangierten zwischen 10 und 100 µM, da Vorversuche mit Konzentrationen über 100 µM einen toxischen Effekt auf die Zellen gezeigt hatten. Nach Zugabe wurde das H₂O₂ entweder auf dem Gewebe belassen oder nach 2 Stunden durch Waschen mit Kulturmedium wieder entfernt. Als Kontrolle wurden Zellen des gleichen Spenders und der gleichen Passagezahl parallel nur mit Kulturmedium ohne H₂O₂ behandelt. Es stellte sich heraus, dass Konzentrationen von 50 bis 100 µM einen deutlichen und persistierenden inhibitorischen Effekt auf die Proliferation hervorriefen, unabhängig von der Tatsache, ob das Kulturmedium nach 2 Stunden durch frisches Medium ersetzt wurde oder nicht, während die Konzentration von 10 µM nur einen schwachen oder gar keinen Effekt auf die Zellen ausübte.

5.1.2. Vorversuche mit Zigarettenrauchextrakt (CSE)

Die initialen Versuche mit Zigarettenrauchextrakt hatten gezeigt, dass Konzentrationen von 10 % der Stammlösung einen toxischen Effekt auf Lungenfibroblasten hatten, der sich in einem induzierten Zelltod und einer Abnahme der Zellzahl äußerte. Die nachfolgenden Versuche erfolgten demzufolge mit einer Konzentration des CSE von 1, 2 oder 5 % der Stammlösung. Die Untersuchungen erforderten zum einen, dass eine ausreichende Zellzahl für zuverlässige Zählungen vorlag, andererseits, dass die Exposition früh genug erfolgte, um noch persistierende Effekte erkennen zu können. Vorversuche hatten ergeben, dass unter diesen Bedingungen die Exposition am günstigsten 5-7 Tage nach Aussaat der Zellen in die Platte erfolgte. Die Zellzahl wurde sowohl vor als auch nach Exposition und bis zum Erreichen eines Plateaus ermittelt. Aus organisatorischen Gründen variierte der Abstand der Zählzeitpunkte geringfügig. In der Regel wurde jedoch alle 2-3 Tage eine Zählung vorgenommen.

Die Exposition erfolgte bei einem Teil der Versuche dauerhaft, d.h. unter Verbleiben des CSE auf den Zellen; hierbei wurde in regelmäßigen Abständen frisches Kulturmedium hinzugegeben. In anderen Versuchen erfolgte die Exposition

temporär, wobei nach 2 Tagen ein möglichst weitgehender Wechsel des Kulturmediums vorgenommen wurde. Da sich in Vorversuchen bei einem vollständigen Mediumwechsel beobachten ließ, dass die Zellzahl massiv beeinflusst wurde, wurde das Kulturmedium nicht vollständig abgesaugt, sondern bis auf einen Rest von ca. 10 % des Volumens. Dieser Waschvorgang wurde 3x wiederholt, so dass unter der Annahme einer Durchmischung nach dem Wechsel rechnerisch nur ca. 0,1 % des ursprünglichen Mediums auf den Zellen verblieb. Aus Gründen der Gleichbehandlung wurde mit den Zellen der Kontrollgruppe in derselben Weise verfahren.

In den Vorversuchen wurde der Zigarettenrauchextrakt noch in PBS gelöst auf die Zellen aufgebracht. Diese Versuche wurden jedoch zugunsten einer Lösung des CSE in D-MEM verlassen, da vermieden werden sollte, dass das Medium der Zellen durch die Zugabe von CSE in PBS verdünnt wurde. Die Ergebnisse dieser Versuche sind im Anhang unter Punkt 8.4. zu sehen. Es zeigten sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Versuchen mit PBS oder D-MEM.

5.2. Ergebnisse der Hauptversuche

5.2.1. Versuche mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Wie unter 5.1.1 beschrieben, zeigten die Vorversuche, dass es keinen Unterschied machte, ob die Zellen dauerhaft oder nur über 2 h mit 50 μM H_2O_2 versetzt wurden (Abb. 6). Bei beiden Expositionen zeigte sich ein signifikanter Zyklusarrest ($p < 0,05$) gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. Es zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Anstieg der Zahl der mittels Trypanblaufärbung ermittelten toten Zellen gegenüber den lebenden. Bei den Versuchen mit 10 μM H_2O_2 zeigte sich zwar ein Proliferationsstopp, dieser war jedoch nach einer Exposition über 2 h wieder reversibel (Abb. 5).

Die mit H_2O_2 gewonnenen Ergebnisse belegten, dass die Zellen auf die Noxe reagierten und dass diese Reaktion nicht notwendigerweise in einem dauerhaften Wachstumsstopp bestand, wohl aber bestehen konnte. Dies war die Voraussetzung, um die Frage einer möglicherweise andersartigen, unter Umständen persistierenden Wirkung von Zigarettenrauchextrakt sinnvoll angehen zu können.

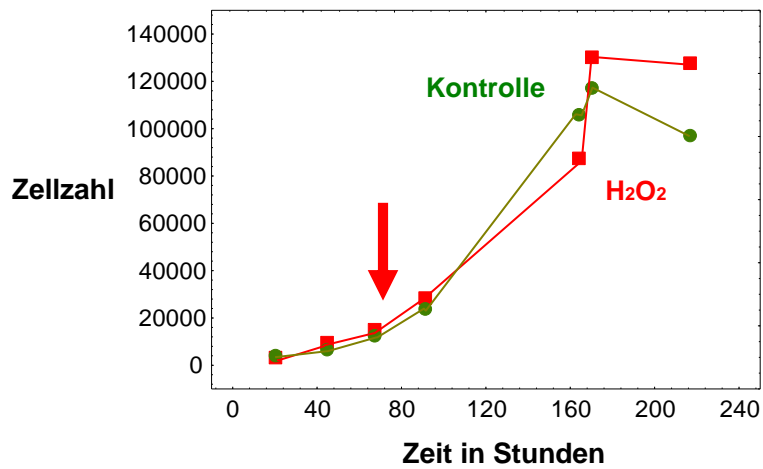


Abbildung 5: Beispiel einer gemittelten Proliferationskurve einer Exposition von Lungenfibroblasten mit 10 µM H₂O₂ über 2 h. Der Zeitpunkt der Exposition ist mit einem Pfeil markiert. Wie aus der Kurve zu entnehmen, zeigte sich nur ein geringfügiger und rasch reversibler Proliferationsstopp der Zellen.

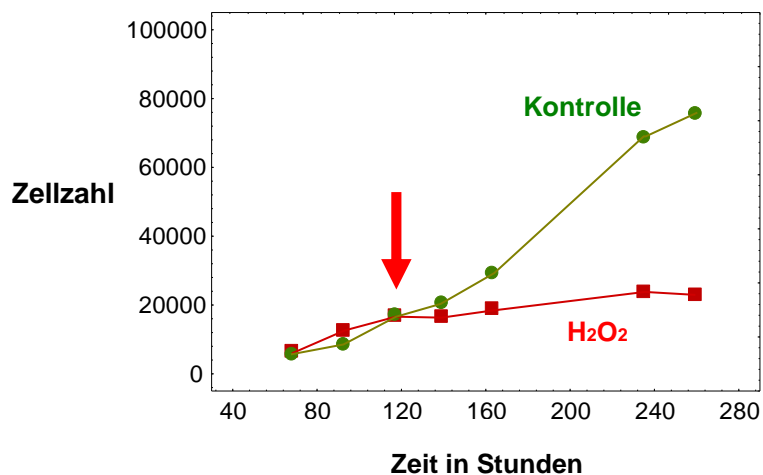


Abbildung 6: Beispiel einer gemittelten Proliferationskurve einer Exposition von Lungenfibroblasten mit 50 µM H₂O₂ über 2 h. Der Zeitpunkt der Exposition ist mit einem Pfeil markiert. Bei dieser Konzentration war ein deutlicher und dauerhafter Zellzyklusarrest ($p < 0,05$) zu erkennen.

5.2.2. Versuche mit Zigarettenrauchextrakt (CSE)

5.2.2.1. Dauerhafte Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt (CSE)

Bei der dauerhaften Gabe von 1, 2 und 5 % CSE ließ sich eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl hervorrufen (jeweils $p < 0,001$; ANOVA). Bei der Gabe von 2 % und 5 % CSE galt dies nicht nur für das Erreichen des Endniveaus, sondern auch für die Interaktionsterme ($p < 0,001$), die einen nichtparallelen Verlauf signalisierten. Zum letzten Messzeitpunkt lag die Zellzahl nach Gabe von CSE im Mittel (\pm SEM) für 1 % CSE um $9,3 \pm 5,2$ % ($n=7$), für 2 % CSE um $44,2 \pm 8,0$ % ($n=5$) und für 5 % CSE um $55,7 \pm 6,5$ % ($n=5$) unter den entsprechenden Zellzahlen der Kontrolle.

Zwecks näherer Analyse wurden die geometrischen Mittelwerte (SEM) des Quotienten CSE *versus* Kontrolle miteinander verglichen. Diese betrugen für 1 % CSE 0,92 (1,06), für 2 % CSE 0,57 (1,14) und für 5 % CSE 0,38 (1,20). Für 2 % und 5 % waren diese Ergebnisse nicht signifikant verschieden, beide waren jedoch kleiner als die Ergebnisse nach 1 % CSE (jeweils $p < 0,005$; t-Test).

Wenn die Zellzahl, die nach 48 h der dauerhaften Exposition gegenüber CSE gemessen wurde, als Bezugsgröße für die Steigerung der Zellzahl nach Exposition gewählt wurde, lag das geometrische Mittel (SEM) der Quotienten (CSE *versus* Kontrolle) für 1 % CSE bei 1,08 (1,07), für 2 % CSE bei 0,94 (1,17) und für 5 % CSE bei 0,36 (1,21). Dabei war der Wert für 5 % gegenüber den anderen beiden signifikant verschieden (jeweils $p < 0,01$). Die Werte von 1 % und 2 % unterschieden sich jedoch nicht voneinander.

Die Zahl der vitalen Zellen, die mittels Trypanblau-Ausschluss ausgewertet wurde, verhielt sich parallel zur Gesamtzellzahl; dies galt entsprechend für die nicht-vitalen, für Trypanblau positiven Zellen. Die mittlere (\pm SEM) finale Reduktion der vitalen Zellen lag im Vergleich zur Kontrolle für 1 % CSE bei $13,7 \pm 6,7$ %, für 2 % CSE bei $44,4 \pm 8,9$ %, und für 5 % CSE bei $55,5 \pm 6,9$ %.

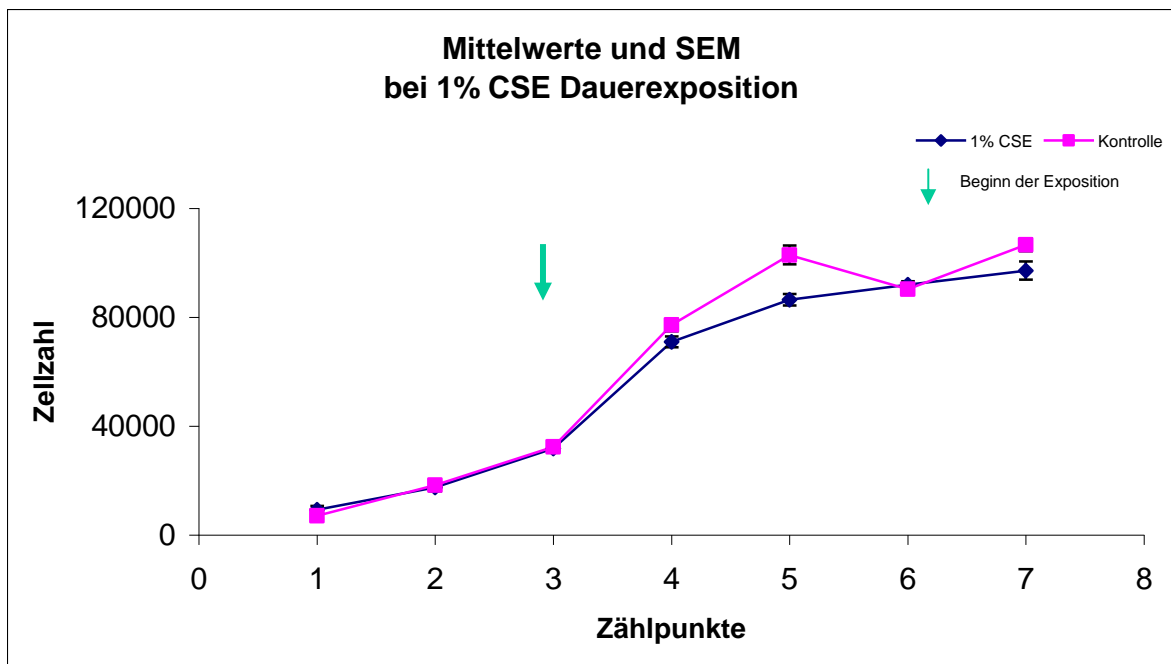


Abbildung 7: Mittelwerte und Standardfehler der absoluten Zellzahlen bei einer dauerhaften Exposition der Lungenfibroblasten mit 1 % CSE. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl ($p < 0,001$). Zum letzten Messpunkt lag die Zellzahl nach Gabe von 1% CSE im Mittel (\pm SEM) um $9,3 \pm 5,2$ % ($n=7$) unter den entsprechenden Zellzahlen der unbehandelten Kontrollgruppe.

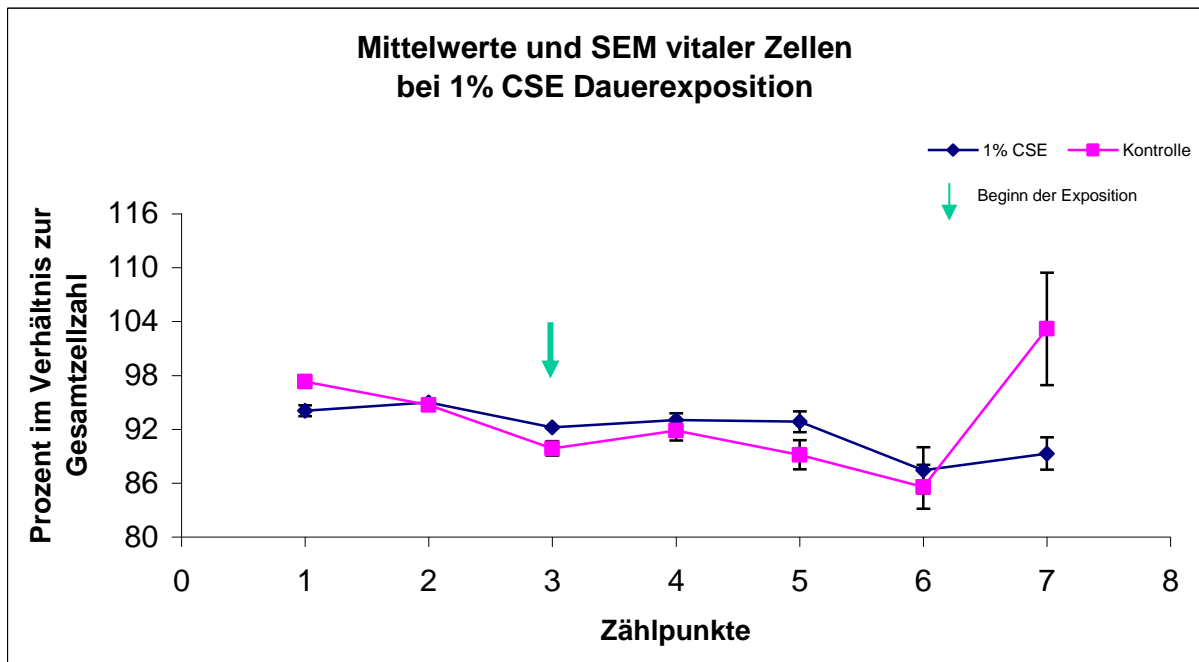


Abbildung 8: Mittelwerte und Standardfehler des Prozentsatzes vitaler Zellen bei 1 % CSE Dauerexposition. Die absolute Zahl der vitalen Zellen verhielt sich demgemäß parallel zur Gesamtzellzahl.

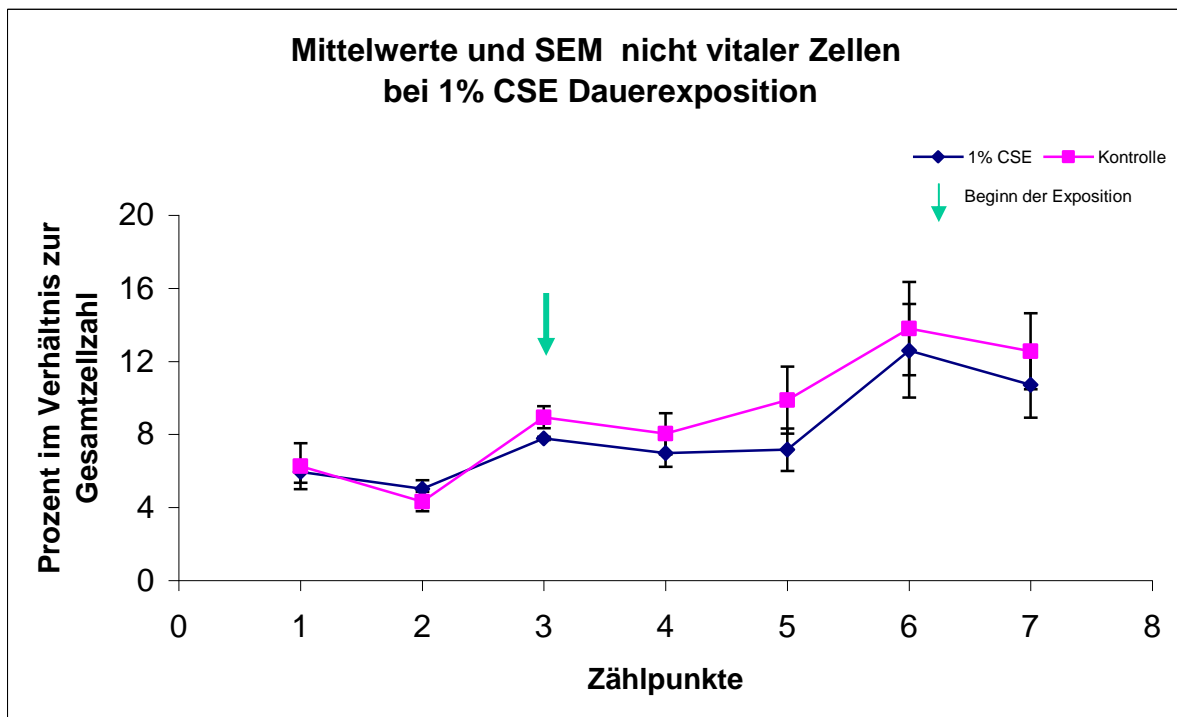


Abbildung 9: Mittelwerte und Standardfehler des Prozentsatzes nicht vitaler Zellen bei 1 % CSE Dauerexposition. Die mittlere (\pm SEM) finale Reduktion der vitalen Zellen lag im Vergleich zur Kontrolle bei $13,7 \pm 6,7$ %.

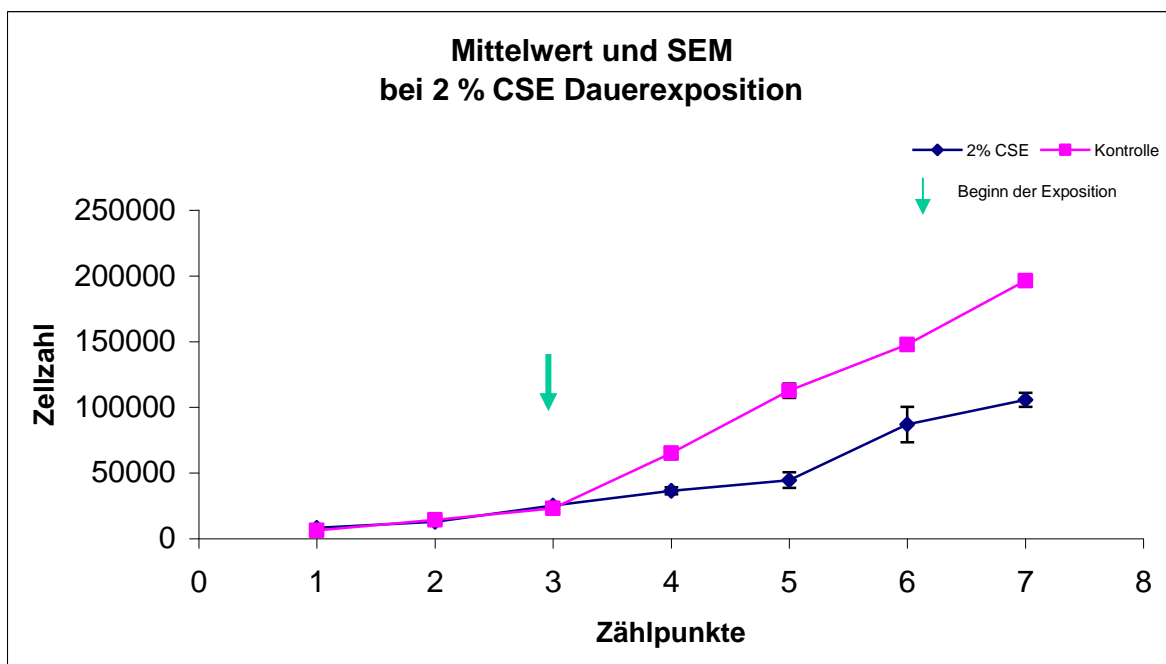


Abbildung 10: Mittelwerte und Standardfehler der absoluten Zellzahlen bei einer dauerhaften Exposition der Lungenfibroblasten mit 2 % CSE. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl ($p < 0,001$). Dies galt nicht nur für das Erreichen des Endniveaus, sondern auch für die Interaktionsterme ($p < 0,001$), die einen nichtparallelen Verlauf signalisierten. Zum letzten Messpunkt lag die Zellzahl nach Gabe von 2% CSE im Mittel (\pm SEM) um $44,2 \pm 8,0$ % ($n=5$) unter den entsprechenden Zellzahlen der unbehandelten Kontrollgruppe.

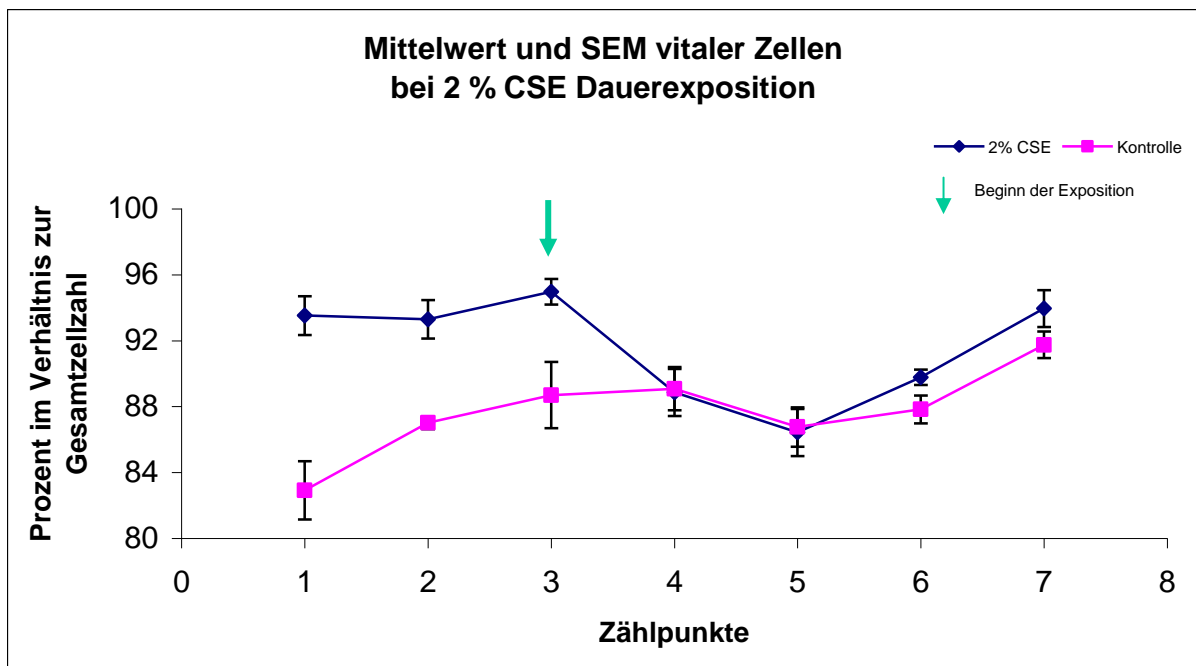


Abbildung 11: Mittelwerte und Standardfehler des Prozentsatzes vitaler Zellen bei 2 % CSE Dauerexposition. Die absolute Zahl der vitalen Zellen verhielt sich parallel zur Gesamtzellzahl. Die mittlere (\pm SEM) finale Reduktion der Zahl der vitalen Zellen lag im Vergleich zur Kontrolle bei $44,4 \pm 8,9$ %.

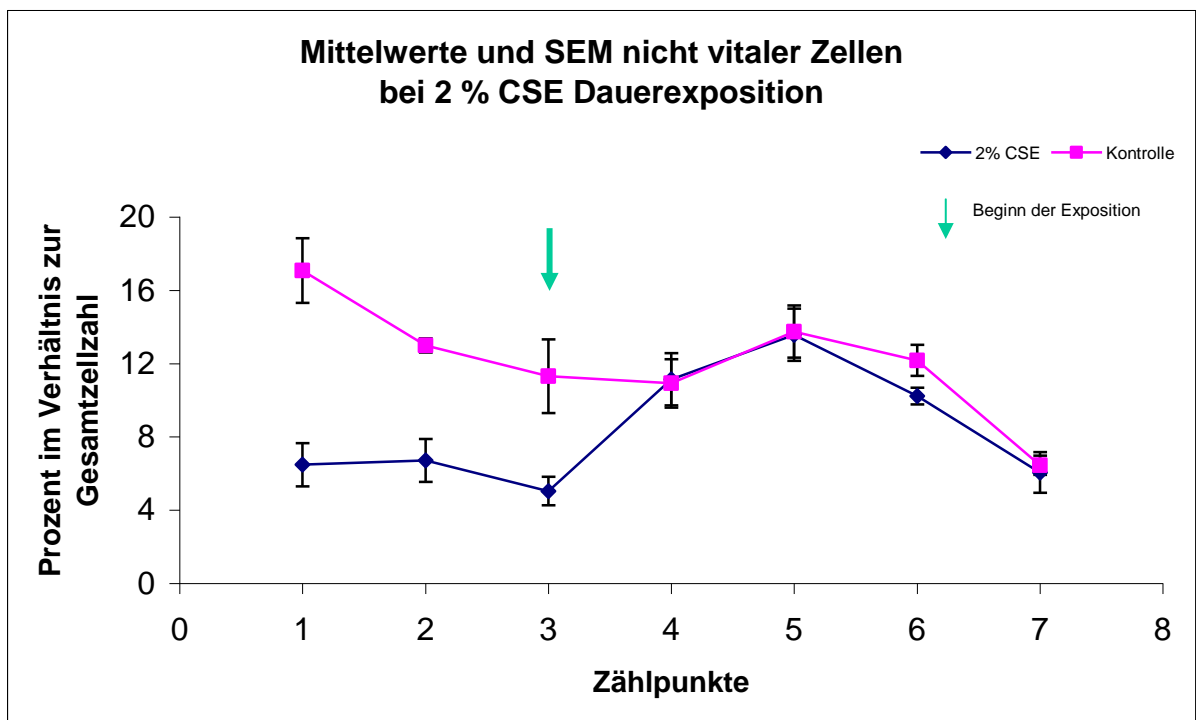


Abbildung 12: Mittelwerte und Standardfehler des Prozentsatzes nicht vitaler Zellen bei 2 % CSE Dauerexposition.

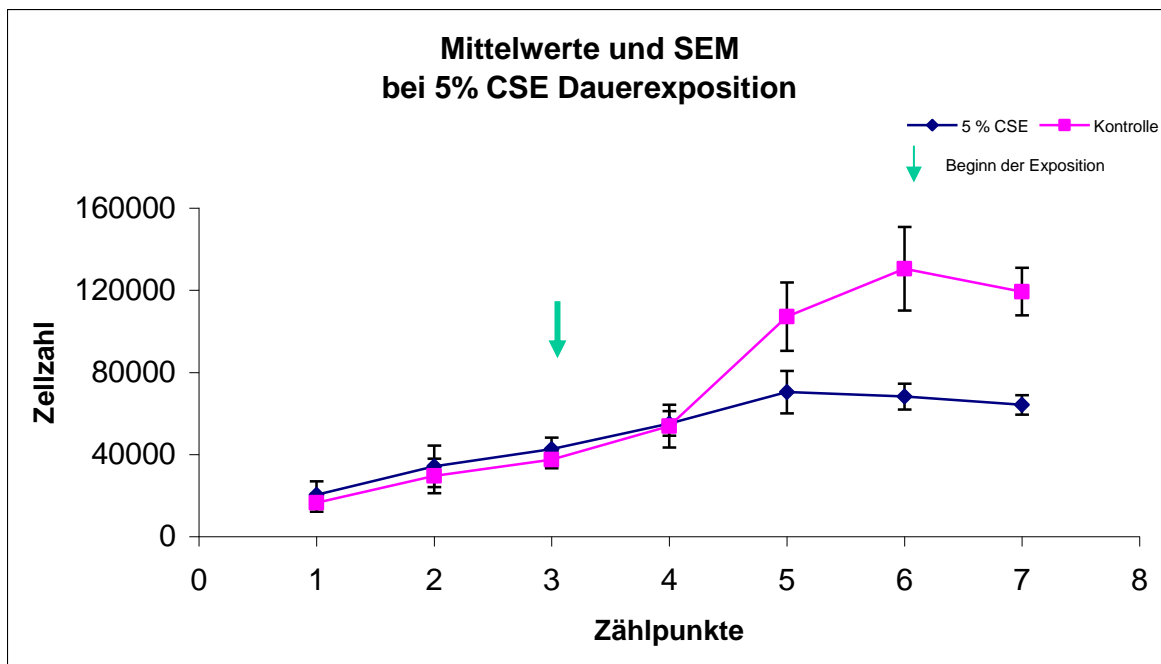


Abbildung 13: Mittelwerte und Standardfehler bei einer dauerhaften Exposition der Lungenfibroblasten mit 5 % CSE. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl. ($p < 0,001$). Dies galt nicht nur für das Erreichen des Endniveaus, sondern auch für die Interaktionsterme ($p < 0,001$), die einen nichtparallelen Verlauf signalisierten. Zum letzten Messpunkt lag die Zellzahl nach Gabe von 5% CSE im Mittel (\pm SEM) um $55,7 \pm 6,5$ % ($n=5$) unter den entsprechenden Zellzahlen der unbehandelten Kontrollgruppe.

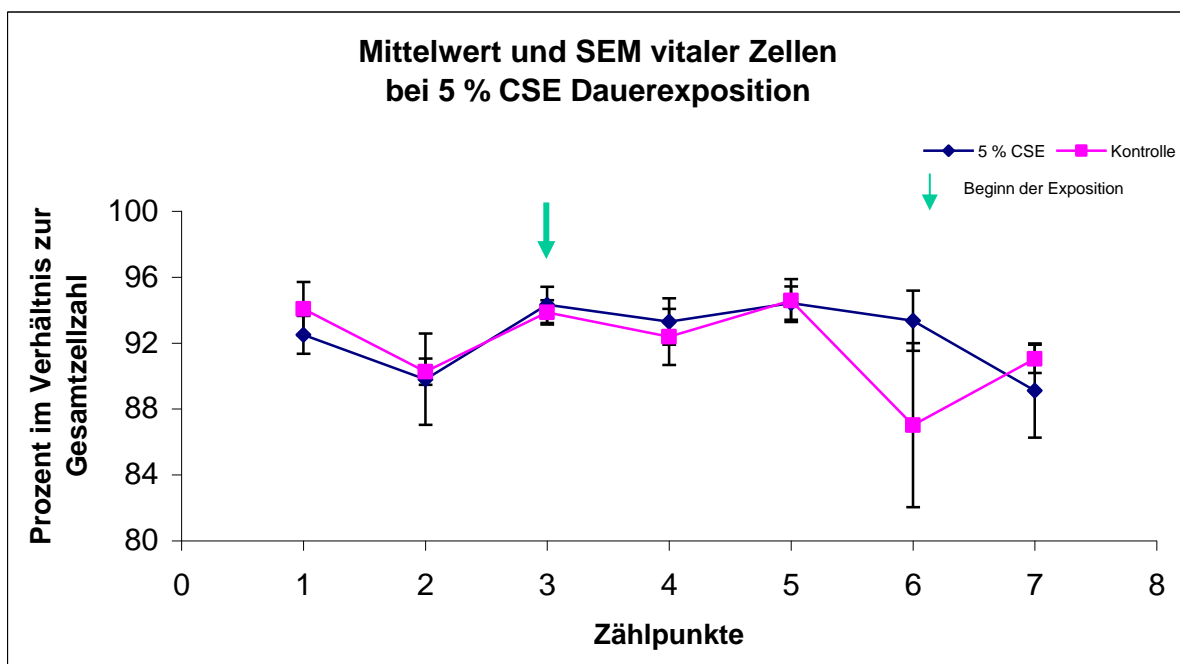


Abbildung 14: Mittelwerte und Standardfehler des Prozentsatzes vitaler Zellen bei 5 % CSE Dauerexposition. Die absolute Zahl der vitalen Zellen verhielt sich parallel zur Gesamtzellzahl. Die mittlere (\pm SEM) finale Reduktion der vitalen Zellen lag im Vergleich zur Kontrolle bei $55,5 \pm 6,9$ %.

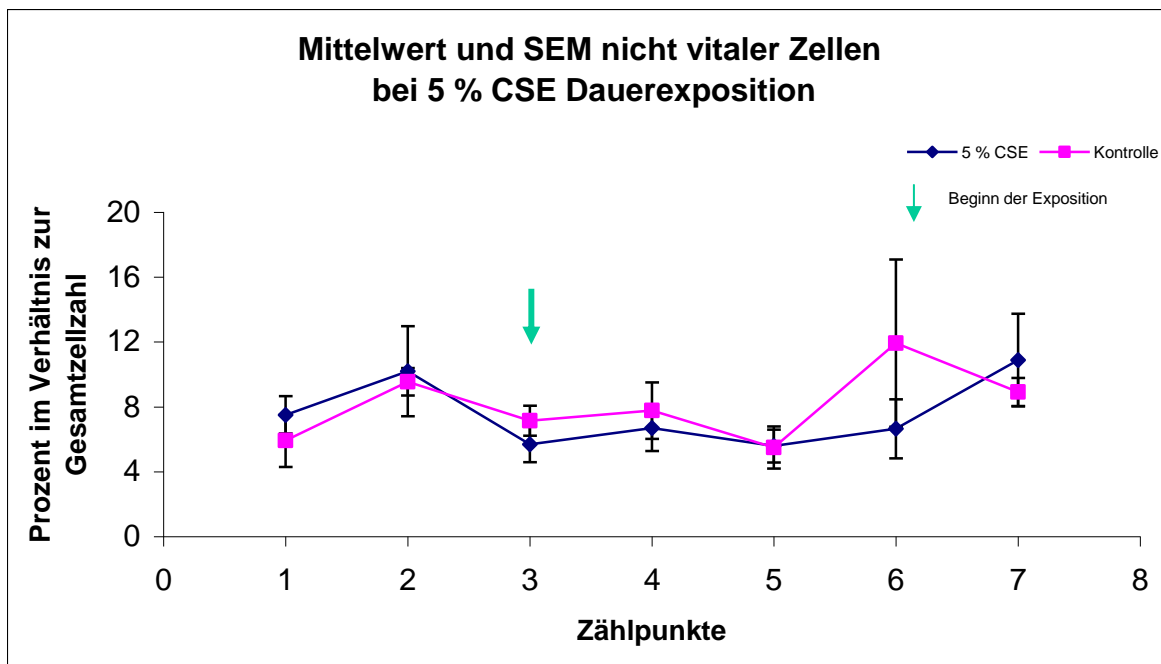


Abbildung 15: Mittelwerte und Standardfehler des Prozentsatzes nicht vitaler Zellen bei 5 % CSE Dauerexposition.

5.2.2.2. Temporäre Exposition gegenüber CSE

Die temporäre, auf 48 h begrenzte Exposition erfolgte, bis auf Vorversuche, ausschließlich mit 5 % CSE, um hinreichende Signalstärken bei nichttoxischen Effekten zu erzielen. Bei Exposition gegenüber 5 % CSE zeigten sich Unterschiede des Verlaufs der Gesamtzellzahl, die sich sowohl im Niveau als auch Interaktionsterm nachweisen ließen (jeweils $p < 0,001$, ANOVA).

Bei CSE- im Vergleich zu Kontroll-Exposition war die mittlere Zellzahl zum letzten Messzeitpunkt auf im geometrischen Mittel 64,6 % (geometrische SEM als Faktor 1,09) reduziert ($n=15$ auswertbare Versuche ohne Pilzbefall oder andere Störungen), entsprechend einem 95%-Konfidenzintervall von 53,6 bis 77,8 % (t-Verteilung mit 14 Freiheitsgraden auf logarithmierte Werte angewandt).

Errechnete man den Steigerungsfaktor der Zellzahl von Beginn der Exposition bis zum Ende des Versuchs relativ zu den Werten unmittelbar vor Exposition und drückte diesen als Quotienten CSE/Kontrolle aus, so ergab sich das geometrische Mittel (geometrische SEM) von 0,62 (1,12). Das 95%-Konfidenzintervall dieses Quotienten rangierte von 0,482 bis 0,796. Ging man von dem unmittelbar nach Ende der Exposition ermittelten Wert als Bezugsgröße aus, so fand sich in analoger Weise

ein geometrisches Mittel (geometrische SEM) des Quotienten der Steigerungen von 0,746 (1,11), mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0,594 bis 0,946. Beide Konfidenzintervalle schlossen demzufolge nicht den Wert 1 ein.

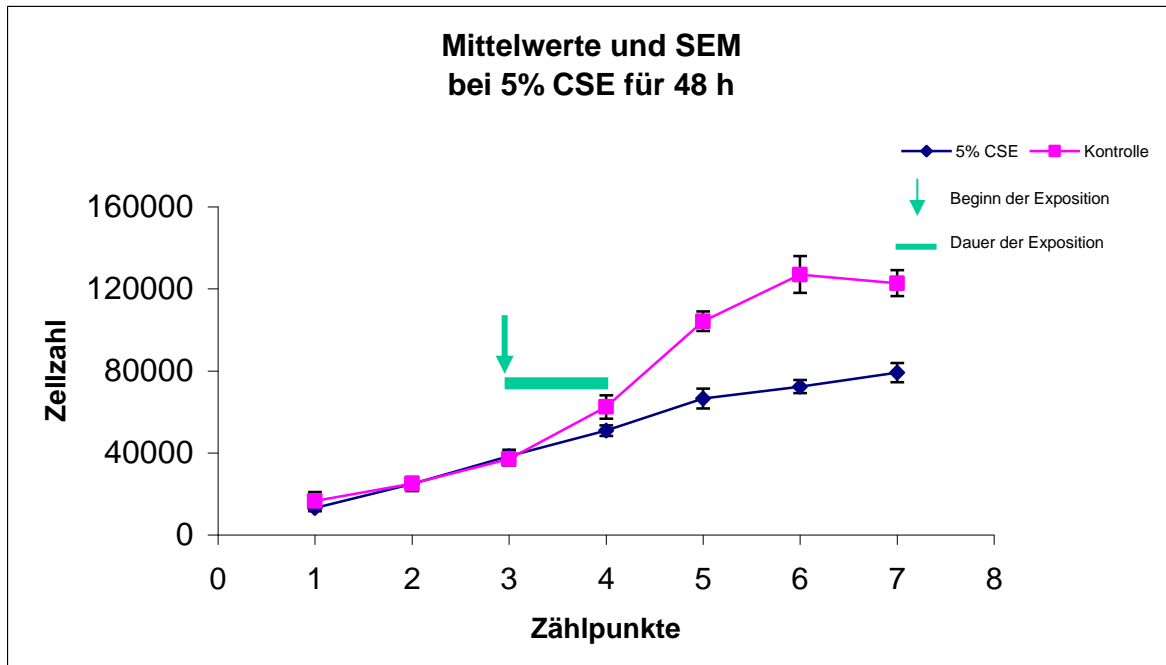


Abbildung 16: Temporäre Exposition mit 5 % CSE über 48 h. Es zeigten sich Unterschiede des Verlaufs der Gesamtzellzahl, die sich sowohl im Niveau als auch Interaktionsterm nachweisen ließen (jeweils $p < 0,001$; ANOVA). Zum letzten Messpunkt war die mittlere Zellzahl auf im geometrischen Mittel 64,6 % ($n=15$) gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen reduziert.

Im Vergleich der Zahlen vitaler und nicht-vitaler Zellen mit der Gesamtzellzahl fand sich ein im Wesentlichen paralleler Verlauf. Zu Versuchende war bei einer Exposition gegenüber CSE im Vergleich zur Kontrolle die Zahl vitaler Zellen um im geometrischen Mittel 65,7 % (geometrische SEM 1,09) reduziert, entsprechend einem 95%-Konfidenzintervall von 54,7 bis 78,9 %; diese Werte waren denjenigen der Gesamtzellzahl ähnlich.

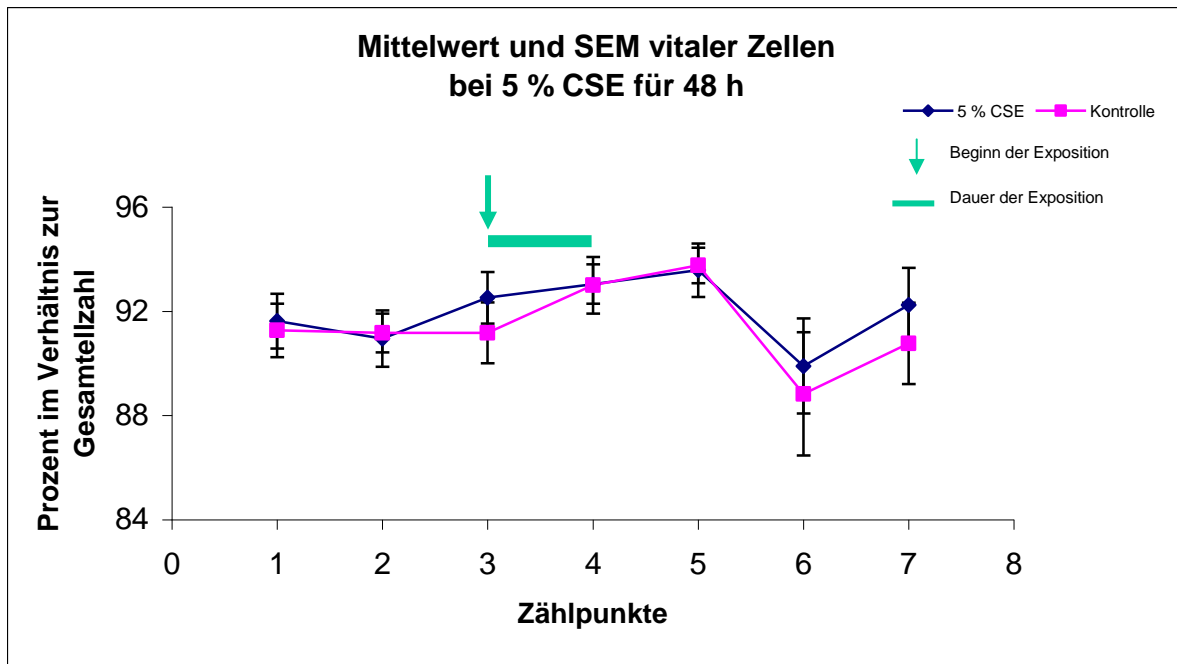


Abbildung 17: Mittelwerte und Standardfehler des Prozentsatzes vitaler Zellen bei 5 % CSE für 48 h. Es fand sich ein im Wesentlichen paralleler Verlauf der vitalen und nicht vitalen Zellen im Vergleich mit der Gesamtzellzahl. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war die Zahl vitaler Zellen um im Mittel (\pm SEM) 65,7 % reduziert

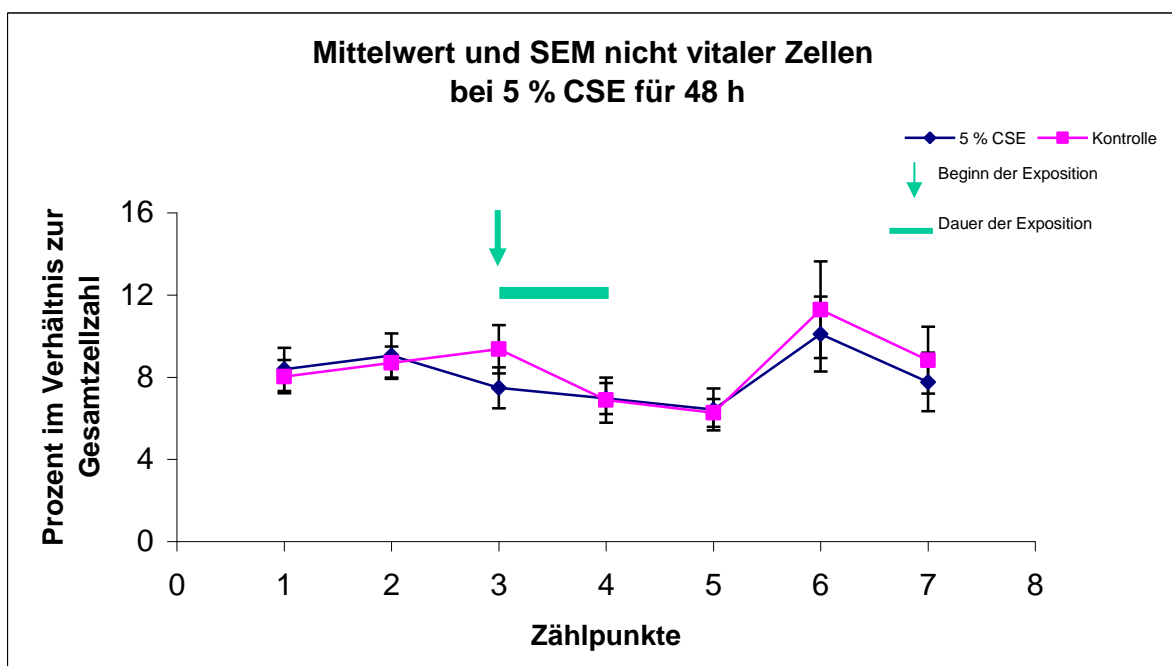


Abbildung 18: Mittelwerte und Standardfehler des Prozentsatzes nicht vitaler Zellen bei 5 % CSE für 48 h. Es fand sich ein im Wesentlichen paralleler Verlauf der vitalen und nicht vitalen Zellen im Vergleich mit der Gesamtzellzahl.

5.3. Überprüfung der Seneszenz mittels β -Galaktosidase-Anfärbung

5.3.1. Versuche mit Natriumbutyrat

Zunächst wurde die Eignung des Seneszenzmarkers SA- β -Galaktosidase überprüft, indem Fibroblasten über 2 Tage mit 5 mM Na-Butyrat versehen wurden (n=3 in Doppelbestimmung). In der Literatur beschriebene Versuche hatten gezeigt, dass Lungenfibroblasten unter dem Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren wie Natriumbutyrat und TSA im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen eine persistierende Reduktion der Proliferationsrate zeigen können [Ogryzko et al 1996a]. In den eigenen Versuchen ergab sich nach Gabe von Na-Butyrat ein signifikanter Anstieg des Anteils β -Galaktosidase-positiver Zellen ($p < 0,005$; ANOVA). Die mittleren (\pm SEM) Prozentsätze β -Galaktosidase-positiver Zellen betrugen nach Na-Butyrat $68,3 \pm 10,5$ % und bei der Kontrolle $30,3 \pm 4,4$ %.

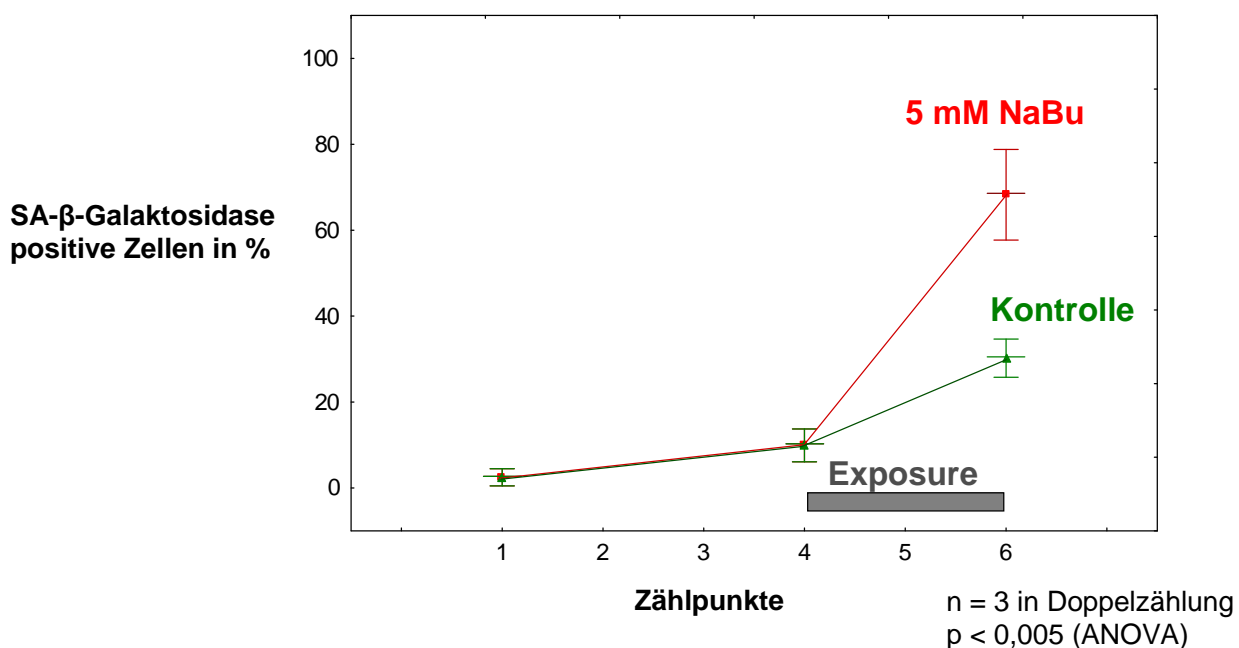


Abbildung 19: Für β -Galaktosidase positive Zellen bei Versuchen mit Natriumbutyrat. Es ergab sich ein signifikanter Anstieg β -Galaktosidase-positiver Zellen ($p < 0,005$, ANOVA). Dabei betrugen die mittleren (\pm SEM) Prozentsätze β -Galaktosidase-positiver Zellen $68,3 \pm 10,5$ % und bei der unbehandelten Kontrolle $30,3 \pm 4,4$ %.

5.3.2. Effekt von Zigarettenrauchextrakt (CSE)

Die 48-stündige temporäre Gabe von 5 % CSE bewirkte einen signifikanten Anstieg der β -Galaktosidase-positiven Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen ($p < 0,005$; ANOVA, $n=5$) (Abb. 20). Vor Exposition waren die Werte beider Gruppe vergleichbar. Nach Exposition wurde zu 4 verschiedenen Zeitpunkten gezählt. Dabei ergaben sich für die gegenüber CSE exponierten Zellen über die 4 Zeitpunkte gemittelte Werte von 17,3 % positiver Zellen. Hingegen beliefen sich die positiven Zellen der Kontrollgruppe auf im Mittel 9,0 %.

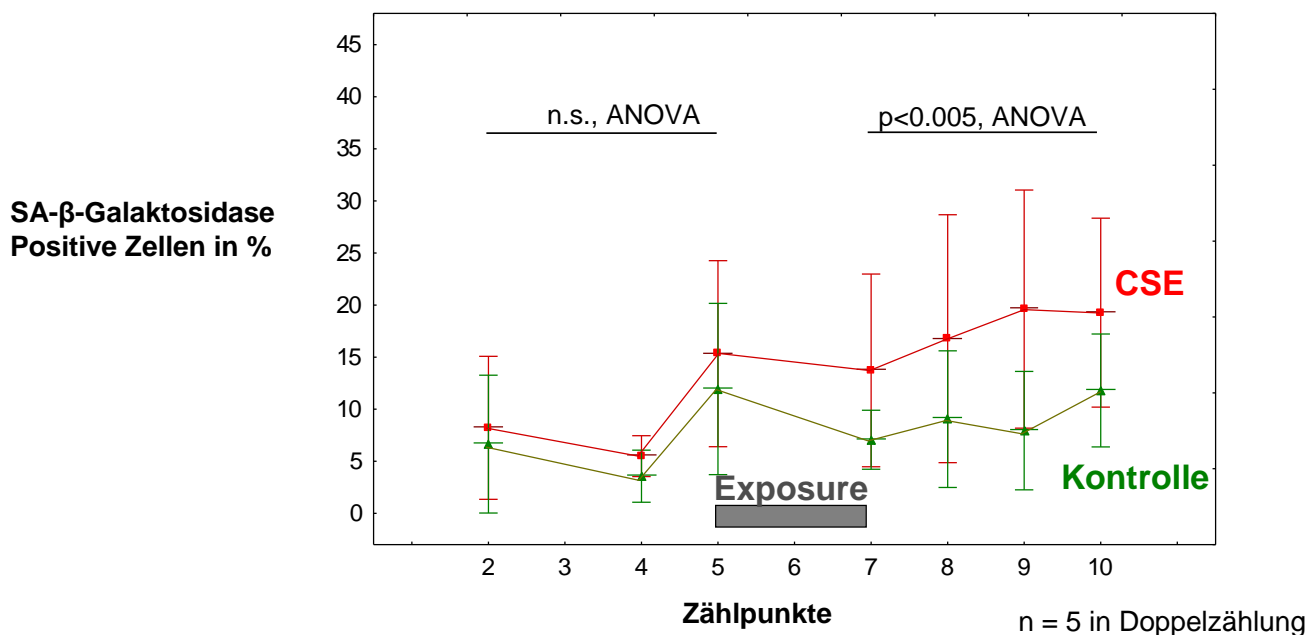
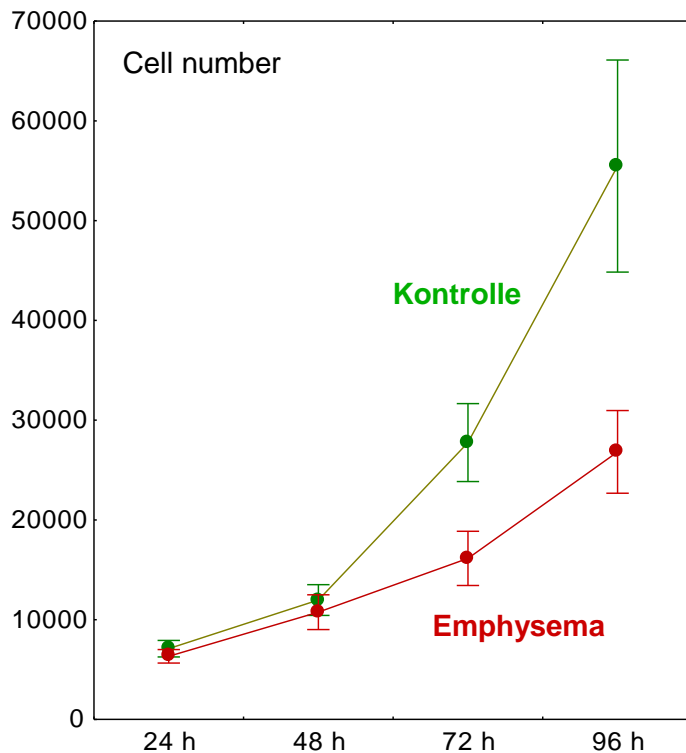


Abbildung 20: Für β -Galaktosidase positive Zellen nach einer Exposition mit 5 % CSE über 48 h. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen ($p < 0,005$; ANOVA, $n=5$). Es ergaben sich bei den mit CSE versehenen Zellen 17,3 % positive Zellen und bei der Kontrollgruppe 9,0 % (gemittelte Werte über 4 Messzeitpunkte).

6. Diskussion

Die Bedeutung des Alterns und insbesondere des zellulären Alterns für die Entstehung und Aufrechterhaltung chronischer Erkrankungen wird inzwischen vielfach wahrgenommen [z.B. Armanios 2013, Kushner 2013, Menni et al. 2013, Montecino-Rodriguez et al. 2013, Newgard & Sharpless 2013], über die Rolle des Alterns in Populationen sowie im Spezies-Vergleich hinaus [Vaupel 2010, Jones et al. 2014]. Neben bekannten Wegen wie demjenigen über Mitochondrien [Bratic & Larsson 2013] sowie speziellen Wegen, beispielsweise über Caveolin-1 [z.B. Volonte et al. 2009], oder speziellen Zelltypen wie den sekretorischen Zellen [z.B. Tchonia et al. 2013] gelten solche Wege als besonders interessant, die eine Integration zwischen Stress, Altern, Langlebigkeit und Ernährung vermitteln, insbesondere die Sirtuine [z.B. Hall et al. 2013]. Diese sind auch Hauptkandidaten der Vermittlung zu epigenetischen Mechanismen, welche das Potential bergen, temporäre Einflüsse dauerhaft einzuprogrammieren. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war nicht die Untersuchung dieser molekularen Mechanismen, sondern der Aufbau eines speziellen Zellkultursystems zur Simulation solcher Effekte *in vitro*. Als Beobachtungsvariable einer induzierten Seneszenz konnten Veränderungen des Verlaufs der Proliferationskurven genügen, nachdem durch weitere Marker und andere Daten sichergestellt war, dass es sich tatsächlich um Seneszenz handelte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung ergaben in der Tat Hinweise darauf, dass eine einmalige, vorübergehende Exposition primärer menschlicher Lungenfibroblasten gegenüber Zigarettenrauchextrakt in Kultur zu einer bleibenden Proliferationsstörung führen kann und diese von Zeichen zellulärer Alterung im Sinne einer verstärkten Anfärbung für die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase begleitet wird. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit vorangegangenen Beobachtungen an Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem, die verglichen mit Zellen von Kontrollpersonen eine reduzierte Proliferationsrate und -kapazität aufwiesen (Abb. 21) sowie vermehrt positiv für β -Galaktosidase waren [Holz et al. 2004].



Holz et al. *Eur Respir J* 2004

Abbildung 21: Reduzierte Proliferationsrate von Lungenfibroblasten bei Patienten mit Emphysem gegenüber einer Kontrollgruppe [Holz et al 2004].

Somit konnten auch im Rahmen eines - notwendigerweise im Vergleich zur *in vivo*-Exposition zeitlich limitierten - *in vitro*-Ansatzes die Beobachtungen an Patienten durch kontrollierte Experimente nachvollzogen werden. Hierbei kann als wesentlicher Befund gelten, dass auch eine temporäre Exposition bleibende Effekte auf Lungenfibroblasten hervorrufen kann, analog der Tatsache, dass die Fibroblasten von Patienten mit Emphysem auch außerhalb der entzündlichen Umgebung ein dauerhaft verändertes Verhalten zeigten. Dieses veränderte Verhalten wurde in der vorliegenden Arbeit wie in vorangegangenen Arbeiten primär über die Proliferationsrate erfasst, die ein unmittelbarer Ausdruck des Grades zellulärer Seneszenz ist. Die relativen Anstiege der Zellzahlen nach vorübergehender Exposition waren nach CSE signifikant geringer als Kontrolle, gleich ob man als Bezug die Zellzahlen unmittelbar vor oder unmittelbar nach Exposition zugrunde legte. Dies äußerte sich numerisch darin, dass der Quotient der relativen Zunahmen nach CSE versus Kontrolle signifikant kleiner als Eins war.

Im Folgenden werden einzelne methodologische und interpretatorische Aspekte der vorliegenden Arbeit kritisch diskutiert und in Zusammenhang mit der vorliegenden Literatur gebracht.

6.1. Bedingungen der Kultur und Auswertung der Zellen

Die Untersuchung primärer Zellen ist häufig besonders von den Bedingungen der Gewinnung dieser Zellen und der Kultur abhängig. In Vorversuchen zeigte sich, dass Zellen, die unmittelbar aus einer Primärkultur gewonnen wurden, höhere Proliferationsraten erzielten als Zellen einer höheren Passagezahl. Zudem ergaben sich Hinweise darauf, dass die Zellen unter einem häufigen Wechsel zwischen Brutschrank und Arbeitsbank, der mit einem Wechsel der Temperatur und CO₂-Konzentration einherging, litten. Deshalb wurde dazu übergegangen, jeweils eine 24-Well-Platte pro Zählung anzuzüchten und diese mit mehreren Zelllinien eines oder verschiedener Spender zu bestücken. Somit waren von der Anzucht bis zur Zählung alle Wells den gleichen, konstanten Bedingungen ausgesetzt. In Vorversuchen zeigte sich bei der Anzucht tiefgefrorener Zellen in Übereinstimmung mit vorherigen Beobachtungen unter ähnlichen Bedingungen [z.B. Holz et al. 2004], dass diese Zellen langsamer wuchsen als die frisch angezogenen Zellen der gleichen Linie vor dem Einfrieren. Daher gingen wir dazu über, ungeachtet der dadurch gegebenen Limitierungen nur frisch angezüchtete und passagierte Zellreihen für die Versuche zu verwenden. Das Primärmaterial erhielten wir auf dem Postweg. Hierbei zeigte sich, dass bereits angezüchtete und versandte Zellreihen störungsanfälliger waren als Zellen, die vor Ort aus einem versandten Stück Gewebe gewonnen und angezüchtet wurden. Um die Abhängigkeit der Ergebnisse von den Anzuchtbedingungen sowie die damit einhergehende Variabilität zu erfassen, wurde nach Möglichkeit versucht, mehrere Versuche der gleichen Zelllinie und Passage parallel anzuzüchten, zu behandeln und auszuzählen. Zudem wurden, nachdem die Vorversuche die notwendigen Bedingungen geklärt hatten, alle Versuche nach exakt dem gleichen Schema durchgeführt.

Primärer Auswerteparameter war die Zellzahl, die direkt durch Zählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde. Diese Methode hatte auch den Vorteil, gleichzeitig eine Abschätzung der Vitalität der Zellen anhand der Trypanblaufärbung zu erlauben. Vorangegangene Experimente [z.B. Holz et al. 2004] hatten

gezeigt, dass die direkte Zählung, obwohl mühsamer und in nicht geringem Maße fehlerbehaftet, anderen, eher automatisierbaren Methoden, insbesondere der BrdU-Inkorporation überlegen war. In der vorliegenden Arbeit erfolgten alle Zählungen in dreifacher Wiederholung an unabhängigen Proben, um ihre Zuverlässigkeit zu erhöhen und Ausreißer zu erkennen. In vorangegangenen Arbeiten hatten sich, wenn die Zellzahl direkt bestimmt wurde [z.B. Holz et al. 2004], Unterschiede zwischen der Proliferationsraten der Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem und Kontrollpatienten gezeigt. Diese Unterschiede zeigten sich jedoch bei anderen Untersuchern nicht, wenn mittels BrdU-Einbau gemessen wurde [Noordhoek et al. 2003].

Ferner stellt die Fähigkeit zur Zellteilung ein sehr direktes Maß des vitalen Zustandes der Zellen dar. Diese ist abhängig von der Anwesenheit ausreichender Wachstumsfaktoren, wie sie durch das zugegebene Serum gewährleistet war, sowie einer ausreichend geringen Zelldichte, so dass keine Kontaktinhibition auftritt. Zellulärer Stress beansprucht die Ressourcen der Zelle, die in der Regel ihre Proliferation reduziert oder einstellt. Eine bleibend reduzierte Proliferation signalisiert, dass auch nach Wegnahme des Stressors ein signifikanter Anteil der Ressourcen beansprucht wird oder eine bleibende, auch durch Wachstumsfaktoren nicht aufhebbarer Änderung eingetreten ist. Im Vergleich dazu haben andere Seneszenzmarker, wie die Messung von Telomerenlängen oder die Induktion von Zellzyklusinhibitoren, einen weitaus spezielleren Charakter. Zur biochemischen Charakterisierung der zellulären Seneszenz wurde die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase gewählt. Zwar ist umstritten, inwieweit dieser Marker ein spezifischer Marker der zellulären Seneszenz ist oder ob er generell einen Marker des zellulären Stress darstellt [Severino et al. 2000], doch erschien diese Unterscheidung in der vorliegenden Arbeit sekundär, da die Seneszenz gerade gezielt über einen zellulären Stress induziert werden sollte.

Da sich in Vorversuchen kein Unterschied der Wirkung von frischem und eingefrorenem Zigarettenrauch-Extrakt, zumindest bei dauerhafter Exposition, gezeigt hatte, wurde durchgängig für die Versuche eingefrorener und jeweils frisch aufgetauter Extrakt verwendet. Zwar kann man davon ausgehen, dass beim Einfrieren und wieder Auftauen flüchtige Komponenten verlorengehen, doch bedeutet die jeweils frische Gewinnung nach aller Wahrscheinlichkeit auch eine stärkere Variabilität der Extrakte, zumal die flüchtigen Komponenten bereits beim

Transport zur Zellkultur bzw. in der Kultur verlorengehen können. Da mit der Verwendung von Primärzellen bereits eine wesentliche Quelle variablen Verhaltens von Versuch zu Versuch vorlag, wurde versucht, durch die Verwendung einheitlicher Aliquots von Zigarettenrauchextrakt diese Quelle der Variabilität möglichst gering zu halten.

Auch stellte sich die Frage, inwieweit *in vivo* die Lungenfibroblasten, im Gegensatz etwa zu Epithelzellen, den flüchtigen Komponenten überhaupt ausgesetzt sind. Aus analogen Gründen wurde der wasserlösliche Anteil des Zigarettenrauchs, wie er in das Kulturmedium aufzunehmen war, verwendet. Das Kulturmedium wurde verwandt, um dem Zigarettenrauch die Möglichkeit der Reaktion mit organischen Bestandteilen zu geben, die grundsätzlich in der Umgebung der Zellen vorkommen können. Von den wasserlöslichen Anteilen ist am ehesten zu erwarten, dass sie sich in der Lunge gleichmäßig verteilen und auch die nicht unmittelbar an der Oberfläche gelegenen Fibroblasten erreichen. Zudem wurde auf diese Weise versucht, auch systemische Effekte von Zigarettenrauch zu erfassen. Für die nicht wasserlöslichen Komponenten kann man eine stärker lokal begrenzte bzw. schwerer definierbare Verteilung erwarten, und die Verwendung entsprechender organischer Extrakte hätte aufgrund der erforderlichen Lösemittel weitere Kontrollexperimente erfordert. Aus diesen Gründen wurde die Verwendung von eingefrorenem, in Kulturmedium aufgenommenem Zigarettenrauch-Extrakt als die praktikabelste und beste Lösung erachtet. *A posteriori* zeigten die beobachteten temporären und dauerhaften Effekte, dass der verwendete Zigarettenrauch-Extrakt tatsächlich über eine genügende Menge wirksamer Komponenten verfügte.

6.2. Wirkung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Es ist seit langem bekannt, dass H_2O_2 auch in nichttoxischen Konzentrationen eine dauerhafte Wirkung auf das Wachstum von Zellen ausüben kann [Chen & Ames 1994]. Hierbei kann die Sensitivität der Zellen unterschiedlich sein. Um zu prüfen, ob und bei welchen Konzentrationen die verwendeten primären Zellen gegenüber H_2O_2 empfindlich waren, wurde in Vorversuchen H_2O_2 in verschiedenen Konzentrationen dauerhaft oder vorübergehend auf die Zellkulturen gegeben. Hierbei zeigte sich, dass die primären menschlichen Lungenfibroblasten unter den angewendeten Kulturbedingungen einen dauerhaften Stillstand der Zellteilung entwickelten, der als

Zeichen einer induzierten Seneszenz gelten konnte [Jörres et al. 2005]. Dies galt sowohl für eine dauerhafte als auch für eine temporäre Gabe von H_2O_2 . Bei einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ H_2O_2 ergab sich noch kein merkbarer Effekt, dieser trat erst bei $50\ \mu\text{M}$ auf.

Unserer Ergebnisse waren mit den früher beschriebenen Reaktionen anderer Zelltypen vergleichbar [Chen & Ames 1994] und sprechen daher für die Validität unserer Methoden. Auch die Tatsache, dass das einmalige Aufbringen einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ H_2O_2 keinen merklichen Effekt auf die Proliferation der Zellen hatte, entsprach bereits bekannten Befunden [Chen & Ames 1994, Chen et al 1998]. Diese Beobachtungen belegten, dass die verwendeten primären parenchymalen Lungenfibroblasten gegenüber H_2O_2 ähnlich reagierten wie die bislang verwandten Zelllinien des Menschen bzw. von Mäusen. Zudem zeigten sie, dass die Kultur- und Auswertebedingungen geeignet waren, um einen derartigen Einfluss tatsächlich zu erkennen. Gemäß dem Fokus der Arbeit auf der Wirkung von Zigarettenrauch dienten die Versuche mit H_2O_2 nur als Vorversuche und wurden nach ihrem positiven Ergebnis nicht weiter verfolgt.

6.3. Wirkung einer dauerhaften Zigarettenrauchexposition (CSE)

Aus früheren bzw. parallel mit der vorliegenden Arbeit erstellten Arbeiten ist bekannt, dass die dauerhafte Exposition gegenüber Zigarettenrauch-Extrakt zu einer dosisabhängigen Reduktion der Teilungsrate bei Zelllinien führen kann [Tsuji et al 2004, Nyunoya et al 2006]. Die hier gemachten Beobachtungen stimmen mit diesen, allerdings vorwiegend nicht an Primärzellen erhaltenen, Ergebnissen überein. Besonders auffallend war, dass die Reduktion der Proliferationsrate im Wesentlichen unmittelbar nach dem Auftragen von Zigarettenrauch-Extrakt zu beobachten war - soweit die Interpretation der variablen Befunde der Primärzellen diese Schlussfolgerung zuließ. Es kam dabei allerdings nicht zu einem völligen Stillstand der Proliferation innerhalb kurzer Zeit, sondern zu einer anhaltenden Verlangsamung.

Diese Beobachtung spricht für das Auftreten gegenregulatorischer Mechanismen, die jedoch den Effekt des Zigarettenrauchs nicht vollständig kompensieren bzw. wieder aufheben konnten. Die statistische Analyse ergab, dass die Zunahme der Zellzahl auch relativ zur jeweils vorhandenen Zellzahl reduziert war. Würde es sich um einen

kumulativen und sich stetig erneuernden Effekt handeln, wären das Eintreten eines Plateaus und der komplette Stillstand der Proliferation zu erwarten gewesen. Zwar wurde bei einer Applikation von 2% Zigarettenrauch-Extrakt kein Plateauwert gegen Versuchsende erreicht, wohl hingegen bei einer Applikation von 5% Zigarettenrauch-Extrakt. Diese Beobachtung legte nahe, dass die Induktion dauerhafter Effekte konzentrationsabhängig sein könnte. Für die Versuche mit temporärer Exposition wurde daher die Konzentration von 5% Zigarettenrauch-Extrakt gewählt, in der Hoffnung, damit eine Balance zwischen einem auch bei transienter Exposition genügend starken und einem noch nicht im eigentlichen Sinne toxischen Effekt zu erreichen.

6.4. Wirkung einer temporären Zigarettenrauchexposition (CSE)

Die temporäre Exposition diente dem Ziel, zu prüfen, ob eine vorübergehende Gabe einer Noxe in nichttoxischer Konzentration eine bleibende Wirkung hervorrufen kann. Dieses Ziel stellte die Hauptfragestellung der vorliegenden Arbeit dar. In der Tat zeigte sich, dass nach Entfernung des Zigarettenrauch-Extrakts zwar die Zellen vorübergehend das Wachstum wieder aufnahmen, jedoch mit einer relativ zur Zellzahl geringeren Rate als vor Exposition und ohne die absolute und relative Zellzahl der Kontrolle gegen Versuchsende zu erreichen. Da die Proliferationskurve der Kontrollzellen eine spontane Abnahme der Zellteilungsrate gegen Versuchsende zeigte, war es in dem verwendeten Versuchsansatz nicht möglich, mit den primären Lungenfibroblasten nachfolgende weitere temporäre Expositionen durchzuführen, ohne dass die induzierte Seneszenz mit der spontan entwickelten interferierte. Auch zeigten gegen Ende des Versuches hin die Zellkulturen teils ein stark variables Verhalten bzw. erhöhte sich das Risiko einer Kontamination, so dass im Rahmen dieses Ansatzes über den weiteren Verlauf keine Aussage getroffen werden konnte.

Wichtig ist es, festzuhalten, dass die Frage nach der Dauerhaftigkeit des Effektes nur mit dem verwendeten Versuchsaufbau beantwortet werden konnte. Eine dauerhafte Exposition hätte zwar möglicherweise stärkere Effekte hervorgerufen, doch wären die akuten Wirkungen nicht von induzierten dauerhaften Wirkungen zu trennen gewesen. Interessant erscheint auch die Beobachtung, dass der Gesamtverlauf der Proliferationskurven bei dauerhafter Gabe von Zigarettenrauch-Extrakt sowie nach vorübergehender Gabe ähnlich war (vgl. Abb. 13 und Abb. 16).

Daher steht in Übereinstimmung mit den unter 6.3 angeführten Überlegungen zu vermuten, dass auch die dauerhafte Exposition den wesentlichen Teil ihrer Wirkung aus der initialen Reaktion bezieht.

Ungeachtet der genannten Einschränkungen sowie der statistischen Limitationen aufgrund der Variabilität zwischen den Primärkulturen verschiedener Anzuchten bzw. Spender, lässt sich als statistisch sicherbar festhalten, dass weder die relative Wachstumsrate noch die finale Zellzahl nach temporärer Zigarettenrauchexposition mit denjenigen der Kontrollzellen übereinstimmen. Ginge man davon aus, dass die Zellen einen beispielsweise an Telomeren gekoppelten Zähler haben, der primär an die Teilungszahl der Zellen, nicht hingegen an ihren physiologischen Zustand, gekoppelt ist, so wäre zu erwarten gewesen, dass die Zellen nach Beendigung der Zigarettenrauchexposition aufholen und wiederum die vorbestimmte Zellzahl erreichen würden bzw. die relativen Proliferationsraten identisch gewesen wären, im Gegensatz zu den Daten. Diese Beobachtungen bringen, in Übereinstimmung mit anderen Beobachtungen [z.B. Holz et al. 2004] Belege dafür bei, dass Zigarettenrauch nicht nur einen akuten Effekt ausübt und somit - möglicherweise noch verstärkt bei wiederholter Exposition - eine zelluläre Seneszenz auch *in vivo* hervorrufen kann.

Die Ergebnisse stimmen grundsätzlich überein mit denjenigen einer Arbeit an der Fibroblasten-Zelllinie HFL-1, die erschien, als die Experimente der vorliegenden Arbeit zum Abschluss gelangt waren [Nyunoya et al. 2006]. Auch hier wurde eine dosisabhängige Reduktion der Proliferation gefunden, allerdings kein dauerhafter Effekt. Diesen erreichten die Fibroblasten erst nach mehrmaliger Exposition. Der Vergleich mit den Befunden der vorliegenden Arbeit deutet auf eine größere Sensitivität der Primärzellen gegenüber Zigarettenrauch-Extrakt hin. Die größere Sensitivität der Zellen äußerte sich nicht zuletzt auch darin, dass die proliferative Seneszenz in Kultur auch unter Kontrollbedingungen früher als bei der Zelllinie eintrat, so dass wiederholte Expositionen gar nicht möglich waren. Diese Interpretation scheint umso eher wahrscheinlich, als Nyunoya et al. [2006] frischen Zigarettenrauch-Extrakt verwandten, von dem eher stärkere als schwächere Effekte im Vergleich zum eingefrorenen und wieder aufgetauten wässrigen Extrakt zu erwarten sind.

6.5. Einflüsse auf die Vitalität

Die in dieser Arbeit verwendeten primären menschlichen Lungenfibroblasten zeigten nach der Exposition mit Zigarettenrauchextrakt zunächst eine verminderte Proliferationsrate. Nach einiger Zeit gingen sie dann jedoch in das Endplateau über und damit in das bekannte Stadium der replikativen Seneszenz, auch bekannt als Hayflick-Limit [Hayflick & Moorhead 1961; Hayflick 1965]. In diesem Stadium war in den weitaus meisten Fällen auch bei den Kontrollzellen noch keine Konfluenz erreicht, so dass man als Ursache tatsächlich eine replikative Seneszenz und nicht eine (reversible) Kontaktinhibition annehmen muss.

Im Rahmen der Auswertegenauigkeit verhielt sich die Zahl der vitalen Zellen und der gegenüber Trypanblau positiven, nicht-vitalen Zellen völlig parallel zur Gesamtzellzahl (vgl. Abb. 8; 9; 11; 12; 14; 15; 17; 18). Allerdings war, vermutlich als Ausdruck der Variabilität bei der Auswertung, die relative Streuung größer, insbesondere bei den positiven Zellen. Aufgrund dieser Beobachtungen kann man davon ausgehen, dass die Konzentrationen des Zigarettenrauchextraktes zwischen 1% und 5% niedrig genug waren, um keine messbaren Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen zu haben. In Vorversuchen mit höheren Konzentrationen von Zigarettenrauch als 5% traten eine Reduktion der Vitalität und eine Veränderung der Zellmorphologie auf, so dass diese Konzentrationen eindeutig toxische Effekte hatten. Mögliche Selektionseffekte durch differentielles Absterben besonders suszeptibler Zellen können durch die Beobachtung der Parallelität der Zellzahlen zwar im Prinzip auch für die vorliegenden Versuche nicht ganz ausgeschlossen werden, allerdings kann man davon ausgehen, dass diese allenfalls einen sehr kleinen Teil der Population betroffen haben können.

6.6. Seneszenzmarker

Die Analyse des Markers SA- β -Galaktosidase ergab eine Zunahme der Anfärbung bei Zellen, die gegenüber Zigarettenrauch-Extrakt exponiert worden waren. In der Literatur wurde SA- β -Galaktosidase als Seneszenzmarker beschrieben [Dimri et al. 1995] und in vielen Untersuchungen eingesetzt. Da bekannt ist, dass die Expression der SA- β -Galaktosidase auch unabhängig vom Wachstumsverhalten hervorgerufen werden kann, ist es allerdings auch möglich, dass es sich hierbei allgemeiner um einen Marker für zellulären Stress als um einen spezifischen Seneszenzmarker

handelt [Severino et al. 2000]. In der Literatur ist für Na-Butyrat beschrieben, dass Lungenfibroblasten unter seinem Einfluss eine anhaltende Verminderung der Proliferationsrate zeigen [Ogryzko et al. 1996a] und gleichzeitig Zeichen der Seneszenz; dies belegt auch die Eignung dieses Markers. In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich das Vorliegen einer zellulären Seneszenz jedoch auch morphologisch im Sinne der bekannten Größenzunahme und Verbreiterung der Zellen. Jedoch wurden diese Beobachtungen nicht quantitativ ausgewertet, da kein standardisiertes Verfahren existierte.

Es ist somit davon auszugehen, dass die genannten Einwände die Interpretation der Ergebnisse nicht ungültig machen und die positive Färbung tatsächlich eine Seneszenz anzeigte, deren Auftreten aufgrund ihrer Induktion durch Zigarettenrauch notwendigerweise auch mit einem zellulären Stress einherging. Der hier beobachtete Anstieg der SA- β -Galaktosidase-positiven Zellen auch nach Exposition gegenüber Zigarettenrauch-Extrakt über nur 48 Stunden ähnelt dem Ergebnis einer bereits erschienenen Arbeit [Nyunoya et al. 2006]. Bemerkenswert ist, dass primäre Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem vermehrt positiv für β -Galaktosidase waren [Müller et al. 2006b]. Zudem konnte in der genannten Arbeit durch sequentielle Analysen aufeinanderfolgender Passagen gezeigt werden, dass dieser Marker unter Kulturbedingungen, die den hier verwendeten sehr ähnlich waren, tatsächlich ein Marker auch der proliferativen Seneszenz war.

6.7. Limitation der Versuche

Die durchgeführten Versuche unterlagen notwendigerweise einer Reihe von Einschränkungen, die teils durch die Eigenheiten von Zellkulturversuchen gegeben sind, teils aus der Verwendung primärer Zellen resultierten, teils auf das eingeschränkte Spektrum der Messgrößen und der Variationsmöglichkeiten des Versuchsprotokolls zurückzuführen waren.

Zellkulturversuche stellen unumgänglicherweise eine Vereinfachung gegenüber einer *in vivo*-Exposition dar. Dies gilt nicht nur wegen der in der Regel erfolgenden Monokultur subkonfluenter Zellen, sondern auch deshalb, weil die komplexen Interaktionen zwischen Zellen verschiedener Art ausgeschlossen oder begrenzt sind und die räumliche Struktur der *in vivo*-Situation fehlt.

Die verwendeten Zellen stammten alle aus Primärkulturen auf Explantbasis, die in der Anzucht und Kultivierung vermutlich einer nicht im Detail zu erfassenden und kontrollierenden Selektion unterlagen. Anzunehmen ist, dass eher wuchsstarke Zellen aus der Explantkultur in die nachfolgenden Passagen gelangten. Solche Zellen sind vermutlich weiter vom Zustand der Seneszenz entfernt als nicht oder nicht so gut auswachsende Zellen und bieten insofern das Potential für die Induktion einer Seneszenz durch eine externe Noxe. Da andererseits die Gewebeproben in der Regel von langjährigen Rauchern stammten, die wegen eines Bronchialkarzinoms operiert werden mussten und dabei kein klinisch relevantes Emphysem zeigten, ließe sich auch argumentieren, dass die auswachsenden Zellen *in vivo* gegenüber einer induzierten Seneszenz resistent geworden sein könnten. Da die Proliferationsrate *in vivo* sehr gering sein dürfte, ließe sich gegen dieses Argument wiederum anführen, dass eine geringere Proliferation in vielen Fällen auch mit einem erhöhten Abwehrpotential gegenüber Noxen einhergeht und damit die maximale Stimulation zur Proliferation wieder eine Sensibilität gegenüber solchen Noxen implizierte.

Diese Überlegungen verdeutlichen, dass die Verwendung primärer Lungenfibroblasten in der vorliegenden Arbeit zwar gegenüber der üblichen Verwendung von Zelllinien den Vorteil hatte, mit geringerer Wahrscheinlichkeit Zellen zu untersuchen, die gegenüber der *in vivo*-Situation regulatorisch verändert sind, dass aber dennoch Artefakte nicht auszuschließen sind.

Darüber hinaus bedeutete die Anwesenheit hoher Serumkonzentrationen einen starken Proliferationsstimulus. Dieser ist allerdings erforderlich, um in endlicher Zeit angesichts der anderen Unwägbarkeiten von Zellkulturversuchen zu ausreichenden Zellzahlen und Wachstumsraten und somit zu auswertbaren Signalen zu gelangen. Zeichen der unter den Zellkulturbedingungen bekannten proliferativen Seneszenz im Sinne eines Zellteilungsstopps fanden sich durchgängig am Ende der Versuche. Somit ist davon auszugehen, dass die Reduktion der Wachstumsrate nicht alleine auf die Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt zurückzuführen war, sondern diese mit anderen, spontan seneszenzinduzierenden Mechanismen interferierte oder konkurrierte. Die veränderten Wachstumsbedingungen *in vitro* gegenüber der *in vivo*-Situation können somit eine wesentliche Rolle gespielt haben. Von einzelnen Untersuchern wurde sogar das Phänomen der replikativen Seneszenz generell als Artefakt deklariert [Rubin 1997]. Erwähnt sei jedoch, dass sich beispielsweise die Unterschiede der Proliferationsrate der Lungenfibroblasten von Patienten mit

Emphysem und Kontrollpatienten, die bei hoher Serumkonzentration beobachtet wurden, auch bei niedriger Serumkonzentration auftraten [Holz et al. 2004]. Dies legt nahe, dass zumindest intrinsische Unterschiede des zellulären Verhaltens nicht durch die Kulturbedingungen zum Verschwinden gebracht werden. Dies gilt vermutlich auch für induzierte Unterschiede.

Der in den Versuchen verwendete Zigarettenrauchextrakt enthielt nur die wasserlöslichen bzw. in Kulturmedium in einer Waschflasche aufnehmbaren Komponenten. Es ist davon auszugehen, dass die gasförmigen Komponenten spätestens beim Asservieren und Vorbereiten des Extraktes zur Verwendung verloren gingen. Nicht oder schlecht wasserlösliche waren vermutlich unterrepräsentiert und konnten den Zellen nicht zugeführt werden. Diese Limitationen wurden bewusst in Kauf genommen, da mit ihnen der Vorteil einer besseren Standardisierung verbunden schien. Der Prozess der Gewinnung des Zigarettenrauchextraktes hatte gezeigt, dass die in Rauch enthaltenen teerartigen Substanzen innerhalb kurzer Zeit zu einer Veränderung der Flussraten bzw. Abrauchzeiten führen konnten. Daher erschien es ratsam, größere Mengen eines gepoolten und somit die Vergleichbarkeit der Versuche gewährleistenden Extraktes zu verwenden.

Ferner war die Überlegung, dass die wasserlöslichen Komponenten des Zigarettenrauchs *in vivo* vermutlich auch jenseits des unmittelbaren Expositionsortes Effekte hervorrufen können, was vielleicht bei Lipid- bzw. lipidlöslichen Komponenten weniger der Fall ist. Daher können Ergebnisse, die mit wasserlöslichen Komponenten des Zigarettenrauchextraktes gewonnen wurden, möglicherweise eher auf andere Organe als die Lunge übertragen werden.

In der Tat ist bekannt, dass Raucher in verschiedenen Organen, darunter der Haut, Zeichen einer vorzeitigen Alterung zeigen. Zwar konnten die hier vorgestellten Versuche keinen Hinweis darauf geben, welche Komponente des Zigarettenrauchs die beobachteten Veränderungen hervorrief; dies erfolgte in einer weiterführenden Arbeit [De Ritis 2009] die ergab, dass die Effekte jeweils etwa zur Hälfte auf Nikotin und auf Oxidanzien zurückzuführen waren. Jedoch war im Falle positiver Effekte davon auszugehen, dass bei Verwendung frischen Zigarettenrauchextraktes oder einer unmittelbaren Begasung mit Zigarettenrauch innerhalb eines Brutschanks [Beisswenger et al. 2004] eher stärkere und nicht schwächere Effekte zu erwarten

gewesen wären; allerdings sind Begasungen wegen der Austrocknungsgefahr der Zellen auch artefaktanfällig.

Wie bei Verwendung primärer Zellen üblich, wurden die Versuche auch durch die akzeptable bzw. mögliche Passagezahl der verwendeten Zellen limitiert. Es zeigte sich, dass Zellen mit einer Passagezahl größer 4 eine geringere Proliferationsrate aufwiesen als Zellen einer niedrigeren Passagezahl. Denkbar wäre, dass die Effekte auf das Wachstum der Zellen sowohl von der Passagezahl als auch vom Zeitpunkt der Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt innerhalb des Versuches abhingen. Dies konnte in den vorliegenden Versuchen nicht geklärt werden, sondern war einer weiterführenden Untersuchung vorbehalten [Cannard et al. 2006], die in der Tat Hinweise auf eine zeitabhängige Sensibilität der primären Lungenfibroblasten ergab. Das Zeitfenster, das zur Induktion von Effekten und zur Nachbeobachtung zur Verfügung stand, wurde durch die limitierte Passagezahl und die spontane replikative Seneszenz innerhalb des Versuchs beschränkt. Allerdings ist fraglich, ob beispielsweise die Verwendung geringerer Serumkonzentrationen, die mit einer geringeren Proliferationsrate einhergehen, die Sensibilität der Zellen nicht soweit herabsetzen, dass wiederholte Expositionen erforderlich werden, mit der Folge eines erneut limitierten Nachbeobachtungsfensters.

Darüber hinaus beschränkte sich die vorliegende Arbeit auf die Erfassung der Proliferation als phänomenologischem Marker zellulärer Seneszenz. Die proliferative Kapazität markiert jedoch nicht nur einen wichtigen und etablierten zellulären Endpunkt, sondern stellt im Ergebnis das Resultat vieler verschiedener Prozesse dar. Aufgrund dieses kumulativen Charakters erschien sie zur Erfassung bleibender Veränderungen besser geeignet als molekularbiologische oder immunologische Marker, unter denen zum Zeitpunkt der Untersuchung keiner eindeutig mit zellulärer Seneszenz assoziiert werden konnte. Hingegen ist (replikative) Seneszenz geradezu definierbar über den Verlust des proliferativen Potentials. Als einziger weiterer Marker wurde die Anfärbung für die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase eingesetzt [Dimri et al. 1995]. Dieser Marker ist zwar als Stressmarker [Severino et al. 2000] ebenfalls nicht uneindeutig einer zellulären Seneszenz zuzuordnen, jedoch nach den vorliegenden Daten im Falle einer Seneszenz immer positiv. In den Versuchen wurde auch aus dem Grunde nicht mit biochemischen Markern gearbeitet, da dies in Anbetracht der vielen im Vorfeld zu lösenden experimentellen Probleme den Umfang der Arbeit überschritten hätte. Daher lassen sich keine

Aussagen über Veränderungen auf der molekularen Ebene treffen. Solche Aussagen können zum Teil aus publizierten Daten an Zelllinien abgeleitet werden.

6.8. Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche erlauben die These, dass auch unter den Bedingungen einer Zellkultur die einmalige Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt einen dauerhaften Effekt auf das Proliferationsverhalten primärer parenchymaler menschlicher Lungenfibroblasten ausüben kann. Zwar war der Effekt relativ klein und der Anteil der Reduktion der Zellzahl, der sich aufgrund der akuten Suppression der Proliferation während der temporären Exposition ergab, verglichen mit den späteren Änderungen relativ groß. Dennoch erreichten die CSE-exponierten Zellen am Ende der Exposition statistisch gesichert weder absolut noch relativ die Zellzahl der Kontrollzellen. Somit war ein bleibender Effekt zu beobachten, von dem zu vermuten steht, dass er *in vivo* Konsequenzen für den Prozess des Zellersatzes bzw. der Reparatur hat. Dabei lässt sich leider nicht entscheiden, ob dieser beobachtete Unterschied des Wachstumsverhaltens verglichen mit den andernorts verwendeten Fibroblastenzelllinien vom Kulturmedium oder verwendeten Zigarettenrauchextrakt abhing oder es sich um eine spezifische Eigenschaft der primären Zellen handelte. Da sich in Vorversuchen kein Unterschied der Wirkung von frischem und eingefrorenem Zigarettenrauchextrakt gezeigt hatte, scheint auch der in dieser Untersuchung verwendete eingefrorene Extrakt im Vergleich zu dem sonst verwendeten frischen Extrakt kein triftiger Grund für die genannten Unterschiede zu sein, zumal man davon ausgehen kann, dass eventuell beim Einfrieren verlorengegangene flüchtige Komponenten in frischem Extrakt eher einen stärkeren, als einen schwächeren akuten Effekt hätten haben müssen.

Die vorliegende Arbeit erbrachte somit Hinweise auf zelluläre Gedächtniseffekte im Sinne einer induzierten Alterung durch Zigarettenrauchexposition, welche durch die Anfärbung der gegenüber CSE exponierten Zellen mit β -Galaktosidase unterstrichen wurden. Diese Beobachtungen gehen mit denen einer vorzeitigen Alterung der Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem konform.

Dennoch ist anzustreben, die Expositionsbedingungen in künftigen Untersuchungen zu optimieren, um die zeitliche Beobachtung der Zellveränderungen zu verbessern, unabhängig davon, ob die Exposition dauerhaft erfolgt oder auf eine bestimmte Zeit

terminiert ist. So ist derzeit noch nicht klar, ob eine mehrfache Exposition auch stärkere Effekte an den Zellen hervorruft. Auch konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob der Zeitpunkt der Exposition während einer Proliferationskurve eine Auswirkung auf die Effekte hat, sowie welche molekularen und biochemischen Reaktionen im Detail von einzelnen Komponenten des Zigarettenrauchextraktes hervorgerufen werden.

6.9. Ausblick auf weiterführende Experimente

Weiterführende Experimente sollten die Wirkungen einer wiederholten Exposition gegenüber Zigarettenrauch-Extrakt, sowie die relativen Anteile von Nikotin und oxidativen Bestandteilen des Zigarettenrauchs eruieren. Darüber hinaus ist es erstrebenswert zu prüfen, inwieweit sich bleibende Änderungen der Regulation auf epigenetischer Ebene induzieren lassen, beispielsweise auf der Ebene der kovalenten Änderungen von Histonen, da bekannt ist, dass Histondeacetylasen oxidativ geschädigt werden können.

Die hier vorliegende Untersuchung stellte eine rein phänomenologische Studie dar und war daher im Wesentlichen auf die Erfassung der Proliferation beschränkt. Somit wurden grundlegende Marker der Zellzyklusregulation wie p16, p21, p53, Rb und p38 [z.B. Tsuji et al. 2004, Nyunoya et al 2006] nicht erhoben. Diese, sowie weitere spezifische Indikatoren der Seneszenz, sollten für künftige Studien vorgesehen werden. Dies umfasst auch Änderungen der Chromatin-Organisation, wie die Analyse der Seneszenz-assoziierten heterochromatischen Foci (SAHF) [Zink et al. 2004]. In einer Arbeit konnte beobachtet werden, dass durch den Einfluss von Zigarettenrauch-Extrakt nicht nur eine vermehrte Expression von p16 und p21 auftrat, sondern sich dabei Unterschiede zwischen einer temporären und einer dauerhaften Exposition finden ließen [Nyunoya et al 2006].

Des Weiteren ist bekannt, dass Zigarettenrauch-Extrakt die Aktivität bzw. Produktion der Matrix-Metalloproteinase 1 und 2 erhöhen kann [Kim et al. 2004b, Ning et al. 2006] und dass im Gefolge die Cyclooxygenase-2 die mikrosomale Prostaglandin-E2-synthase induzieren kann [Martey et al. 2004]. Diese Befunde sind unter dem Aspekt des Matrix-Remodelling interessant. Bislang allerdings wurden Daten zu primären menschlichen Lungenfibroblasten und insbesondere solche von Patienten mit Emphysem nur in wenigen Experimenten gewonnen, die für eine sichere

Aussage nicht ausreichen. Auch fokussieren sie sich, wie die vorliegende Arbeit, primär auf die Proliferation [siehe auch Nobukuni et al. 2002]. Um Artefakte auszuschließen, wäre es zudem wünschenswert, bei der Interpretation der Ergebnisse in Zukunft den potentiellen Einfluss der Kulturbedingungen kritischer als bislang zu betrachten [Balin et al. 2002].

7. Zusammenfassung

Die COPD ist eine weit verbreitete Krankheit, die in zwei Phänotypen vorkommt, die allerdings selten isoliert voneinander anzutreffen sind. Dies sind die chronische Bronchitis sowie das Lungenemphysem.

Führend bei der chronischen Bronchitis ist eine entzündliche Reaktion der Bronchiolen, mit reaktiv gesteigerter Schleimproduktion, Verminderung des Zilienschlages und einer erhöhten Permeabilität des Epithels. Hierunter kommt es zu einer Verminderung des Gasaustausches mit nachfolgender Hypoxie und Hyperkapnie. Diese Prozesse finden vor allem im Epithel der zentralen Luftwege und in den schleimbildenden Drüsenzellen statt. Ein Emphysem ist gegeben, wenn die Lufträume distal der Bronchioli terminali irreversibel erweitert sind. Diese Prozesse werden nach gängiger Meinung durch ähnliche entzündliche Prozesse gesteuert wie die chronische Bronchitis; die Unterscheidung zwischen beiden ist Gegenstand vieler derzeitiger Arbeiten. Beim Emphysem führen sie primär zu einer Destruktion der Alveolarsepten und Aufweitung der Lufträume. Während bei der gesunden Lunge die elastische Rückstellkraft dazu führt, dass die Luft wieder aus der Lungen entweichen kann, kommt es beim Emphysem durch die Verminderung der Elastizität zu einem expiratorischen Kollaps. Es werden verschiedene Emphysemtypen unterschieden, wobei das centriacinäre am ehesten mit dem Rauchen von Tabak in Verbindung gebracht wird. Aufgrund der verminderten Elastizität der Lunge und einer vermehrten Blasenbildung durch Destruktion der Septen kommt es zu einer Verringerung des Gasaustausches und in der Folge zu einer Hypoxie und Hyperkapnie. Die Entstehung eines Emphysems ist in der Regel irreversibel.

Unter den Strukturzellen der Lungen spielen die Fibroblasten eine entscheidende Rolle. Werden sie durch innere oder äußere Einflüsse geschädigt, kann es zu Strukturveränderungen der Lunge kommen. Die Fibroblasten in den Alveolen sind Stressoren von außen ausgesetzt und müssen daher in der Lage sein, Schäden zu reparieren. Dazu ist eine hinreichende Teilungsfähigkeit nötig. Sind jedoch die ortsständigen Zellen geschädigt, kann es zu einem Strukturschaden kommen.

Bei Rauchern fällt besonders das frühzeitige Altern auf. Altern geht mit einer Reduktion der Teilungsfähigkeit gealterter Zellen einher. Bei der Entstehung und Progression des Emphysems könnte die Induktion einer zellulären Seneszenz und Störung der Organerhaltung durch Rauchen eine Rolle spielen. Darauf deuten

Arbeiten hin, die seneszente Zellen bei Patienten mit Emphysem nachweisen konnten.

Die vorliegende Untersuchung versuchte experimentell herauszufinden, ob diese Hypothese belegbar ist und insbesondere eine vorübergehende Exposition bleibende Effekte haben kann. Hierzu wurden primäre menschliche Lungenfibroblasten zum einen mit normalem Nährmedium versorgt, zum anderen mit solchem, das zuvor mit Zigarettenrauchextrakt angereichert wurde. Dabei wurden unterschiedliche Prozentdosen verabreicht. In Vorversuchen wurde die Wirkung von Wasserstoffperoxid, von dem eine Seneszenz-induzierende Wirkung bekannt ist, in verschiedenen Dosen untersucht; hier zeigte sich eine gesteigerte Zahl an seneszenten Zellen. In den folgenden Untersuchungen mit bleibender Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt zeigten sich ähnliche Veränderungen. Dabei ergab sich, dass eine Konzentration von 10 % Zigarettenrauchextrakt zu toxischen Effekten führte. Am ehesten erschien eine Konzentration von 5% für eine temporäre Exposition geeignet.

Die Versuche zur Hauptfragestellung erfolgten daher primär mit 5 % Zigarettenrauchextrakt. Die Zellkulturen liefen im Mittel über etwa 14 Tage mit nominell 7 Zählungen in diesem Zeitraum. Zum Zeitpunkt der dritten Zählung wurden die Zellen für 48 h entweder mit Zigarettenrauchextrakt oder Kontrollmedium belastet; die nächste Zählung folgte am Ende der Belastung, weitere folgten bis zu Tag 14. Es zeigte sich in 15 auswertbaren Versuchen ein bleibender Effekt von Zigarettenrauchextrakt in dem Sinne, dass nach Exposition die Proliferation weder absolut noch relativ zur jeweiligen Zellzahl wieder auf die Werte der Kontrollen aufholte (jeweils $p < 0,05$ bei verschiedenen Bezugsgrößen); die Zellzahl betrug am Ende im Mittel nur 65 % der Kontrolle. Hierbei traten keine erkennbaren Effekte auf die Vitalität auf.

In zusätzlich durchgeführten Untersuchungen konnte ein signifikanter ($p < 0,005$) Anstieg von für den Seneszenz- und Stressmarker β -Galaktosidase positiven Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gezeigt werden. Die Eignung der β -Galaktosidase als Seneszenzmarker war für Na-Butyrat in der Literatur beschrieben, derart, dass Lungenfibroblasten unter seinem Einfluss eine anhaltende Verminderung der Proliferationsrate zeigten [Ogryzko et al. 1996a]. Die analoge Wirkung auf primäre Lungenfibroblasten wurde in Vorversuchen mit Na-Butyrat

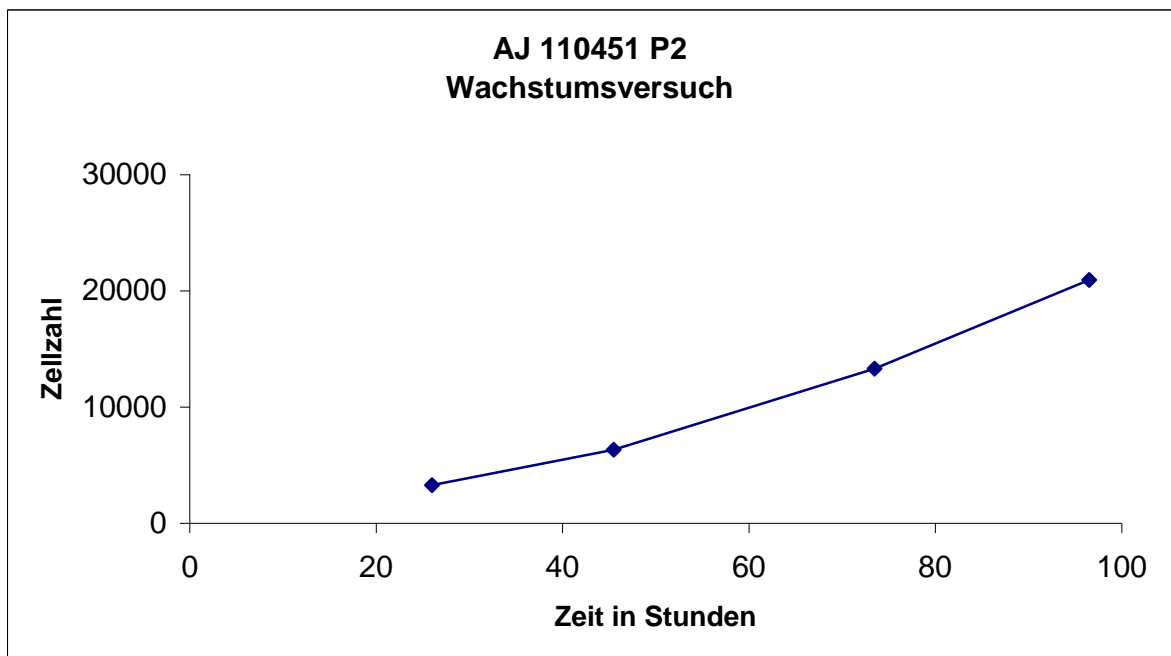
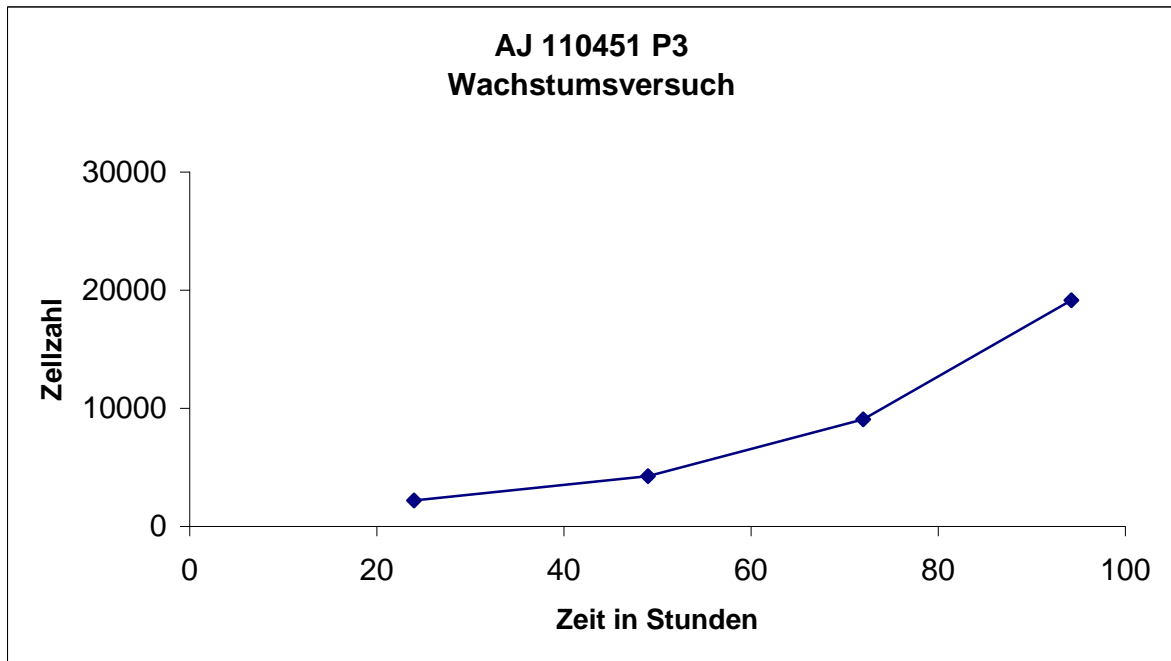
überprüft. Die Seneszenz der Zelle zeigte sich auch zellmorphologisch; es ist daher davon auszugehen, dass es sich tatsächlich um seneszente Zellen handelte.

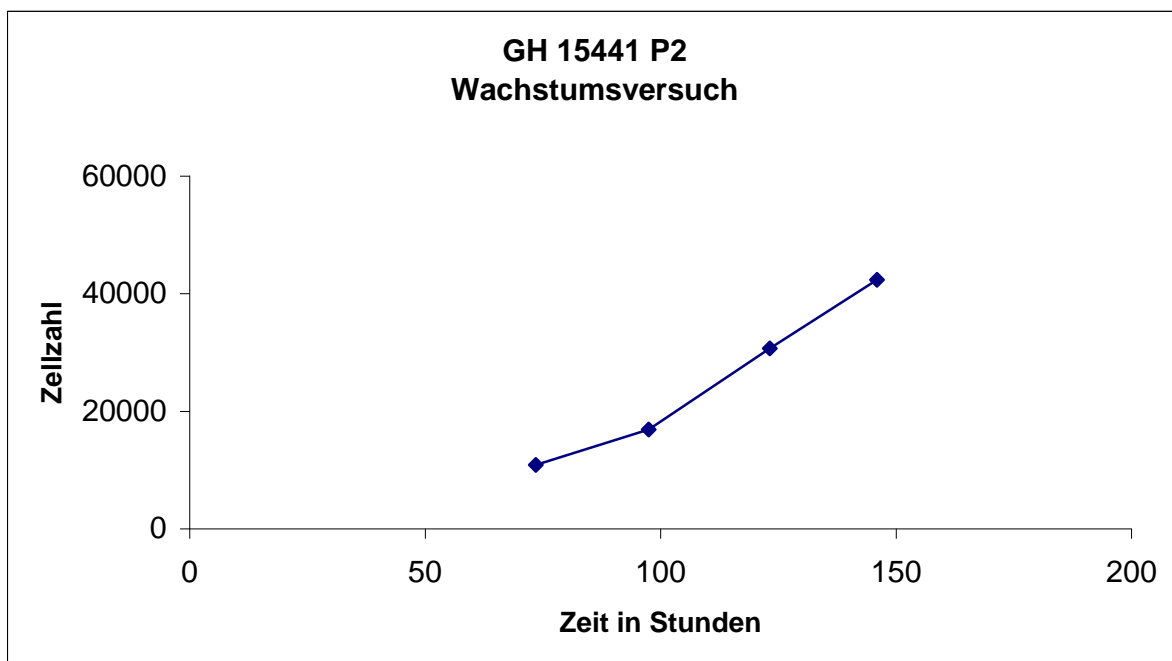
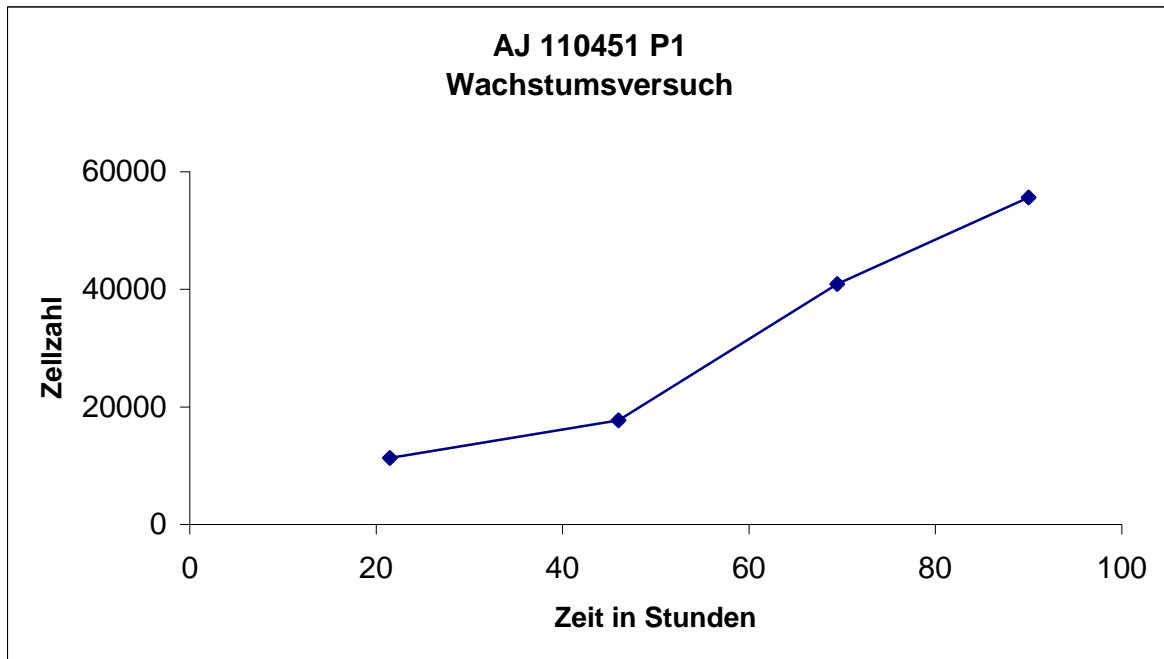
Die vorgelegten Daten weisen daher auf einen dauerhaften Effekt von Zigarettenrauchextrakt nach Beendigung der Exposition hin; die Zellen wurden gewissermaßen durch Voralterung umprogrammiert. Diese Beobachtungen gehen mit der Hypothese konform, dass eine durch Rauchen induzierte zelluläre Seneszenz an der Entstehung eines Lungenemphysems beteiligt sein könnte. In dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob der Effekt davon abhängt, zu welchem Zeitpunkt die Exposition stattfindet, ob sich nach mehrmaliger Exposition andere Effekte auslösen lassen und welche Wirkungen die einzelnen Komponenten des Zigarettenrauches im Einzelnen haben. Dennoch erlauben die Daten die Aussage, dass unter bestimmten, sorgfältig gewählten experimentellen Bedingungen auch durch temporäre Exposition Effekte auf primäre Lungenfibroblasten auslösbar sind, die den Änderungen parallel gehen, die für die Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem beschrieben wurden. Die Untersuchung etabliert und validiert in diesem Sinne ein experimentell handhabbares Modell dieser Erkrankung.

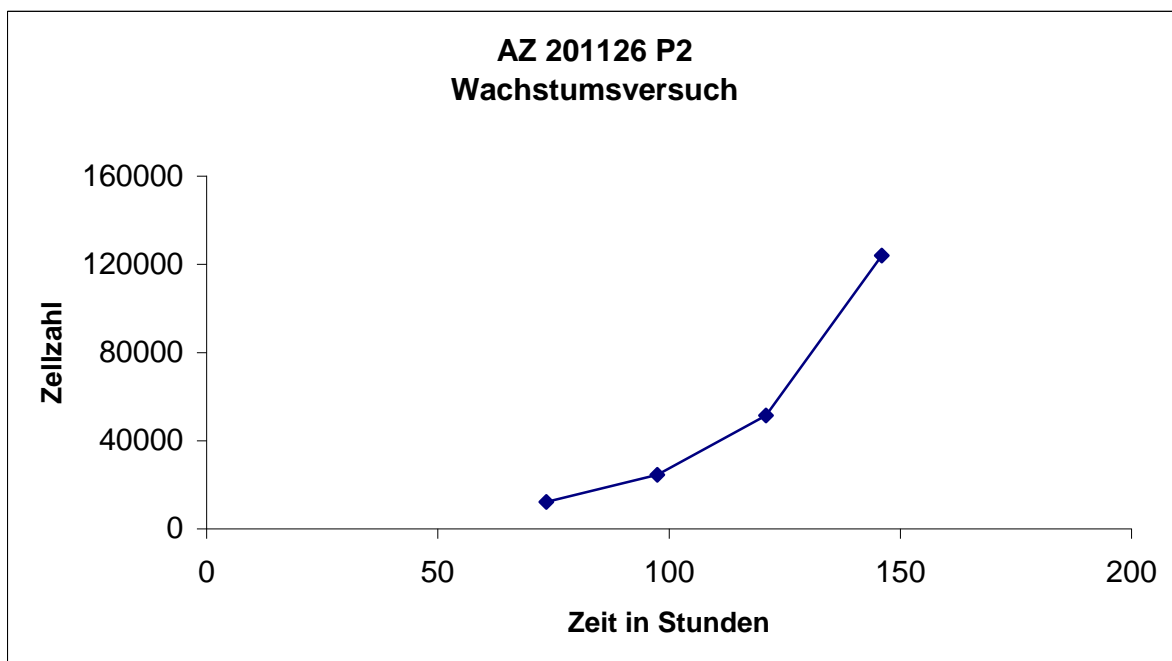
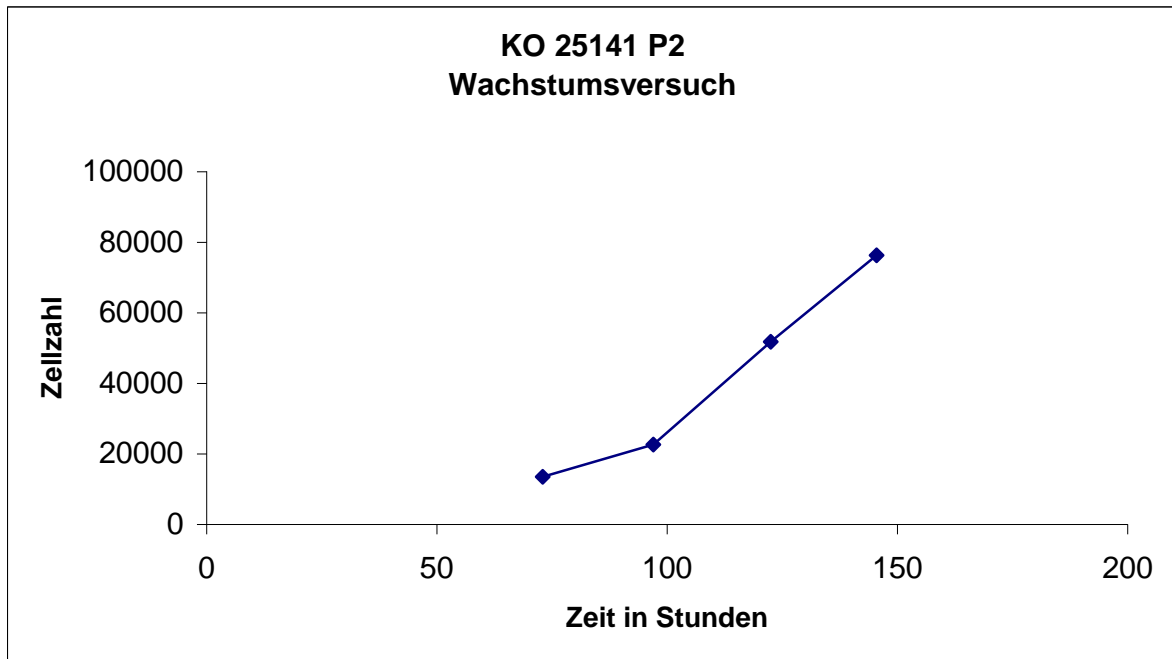
8. Diagramme

Im Folgenden werden zur Dokumentation der Einzelwerte, aber auch der Variabilität der Ergebnisse die Daten aller erfolgreichen, d.h. interpretierbaren und nicht durch Kontamination oder andere Unbilden mißglückten Versuche gezeigt. Die Kürzel sind interne Label des Versuchs und der verwendeten Zellen. Aufgrund von unterschiedlichen Zellzahlen der verschiedenen Proben konnte keine einheitliche Skalierung gewählt werden. Dies ist bei dem Vergleich der Diagramme zu beachten.

8.1 Wachstumsdiagramme

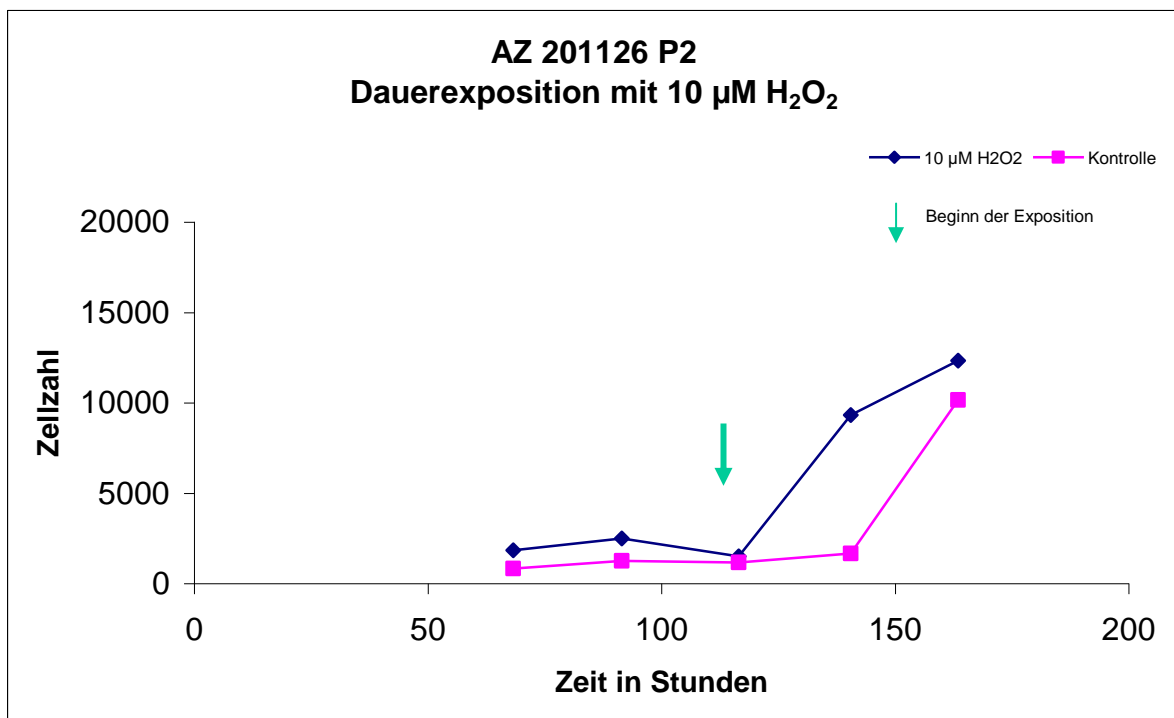
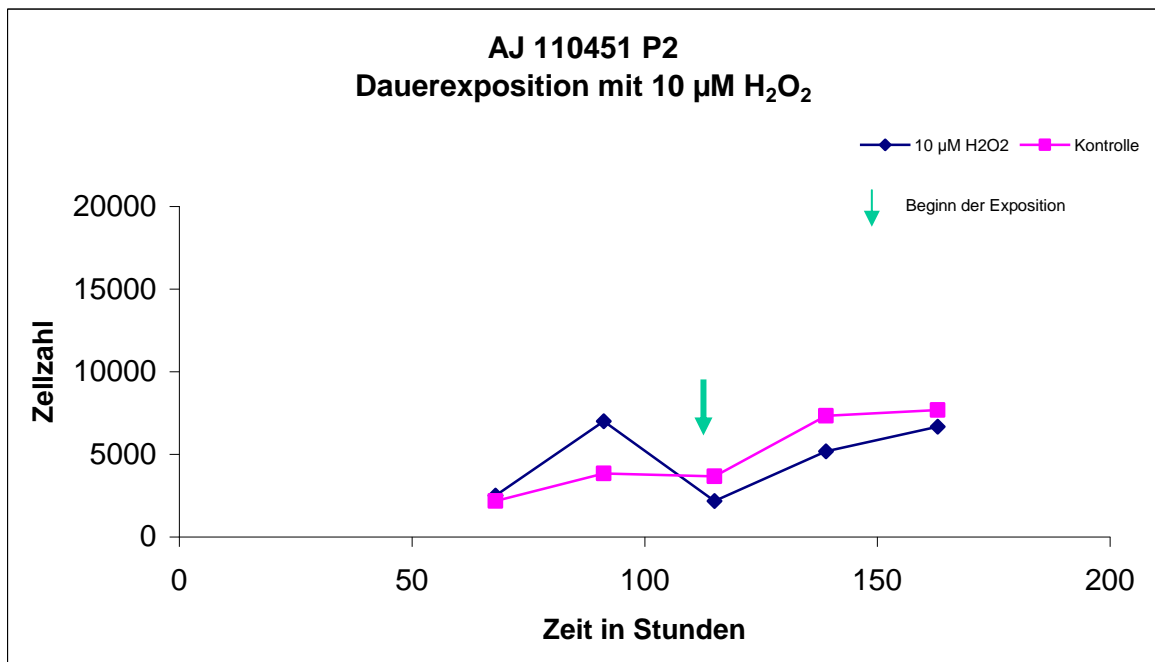


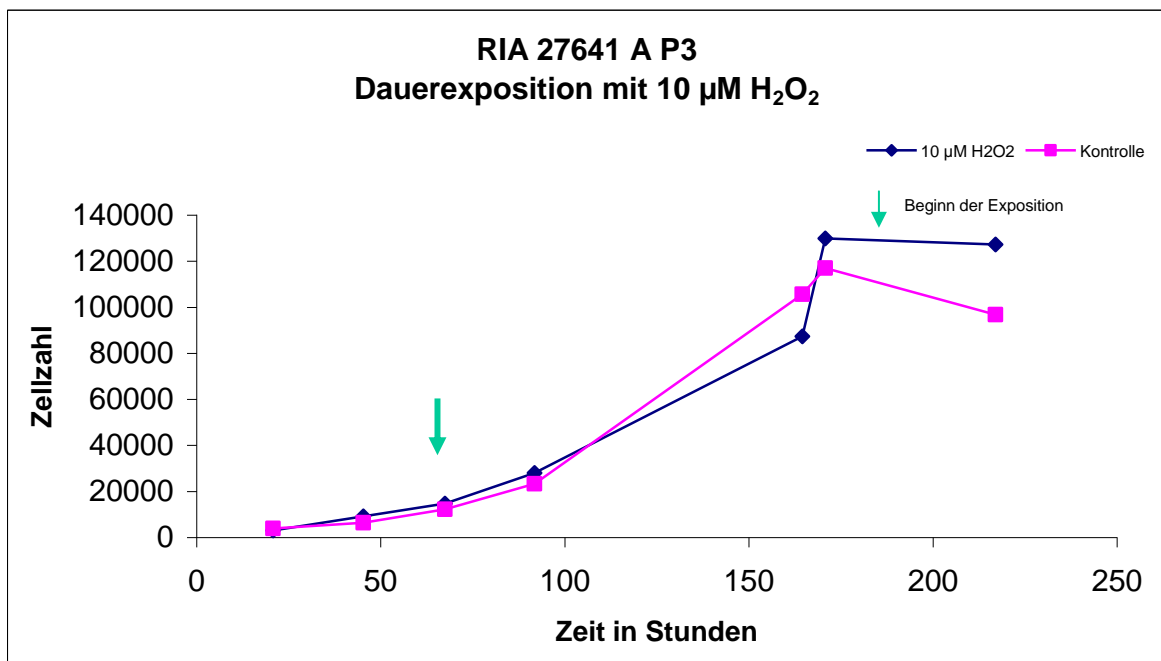
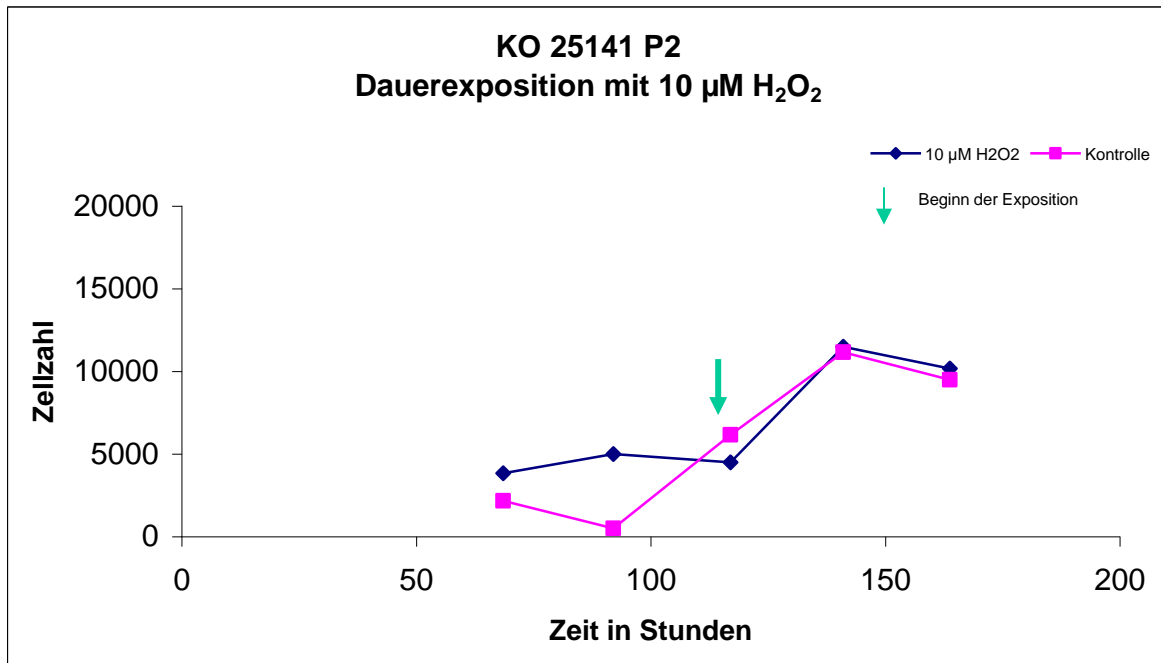




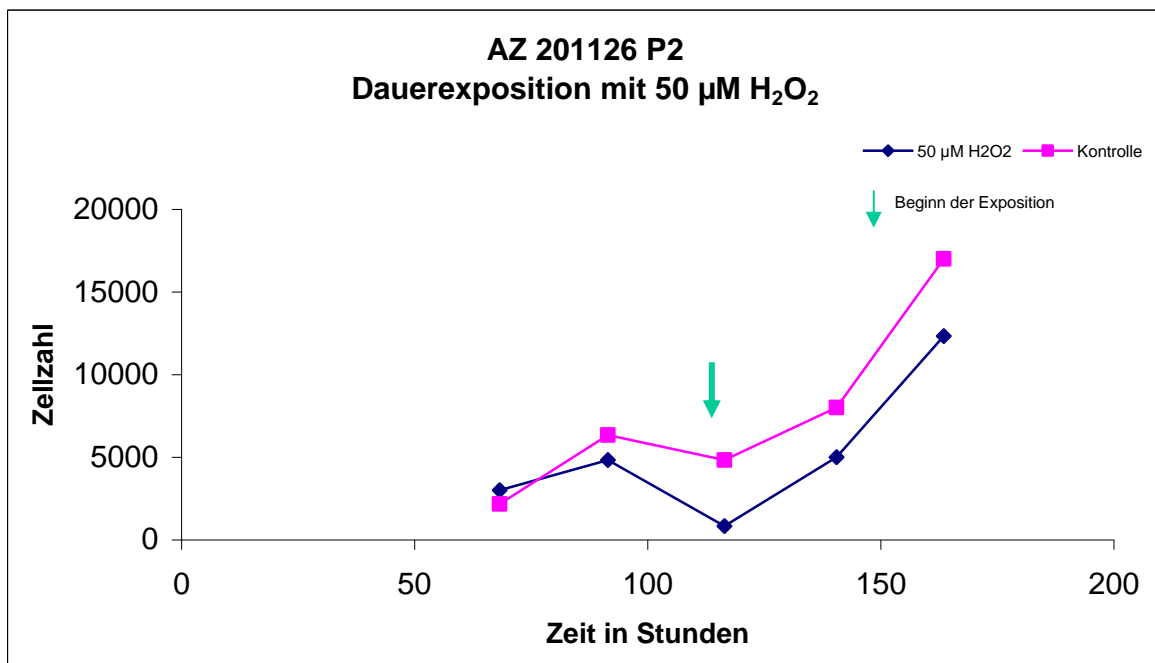
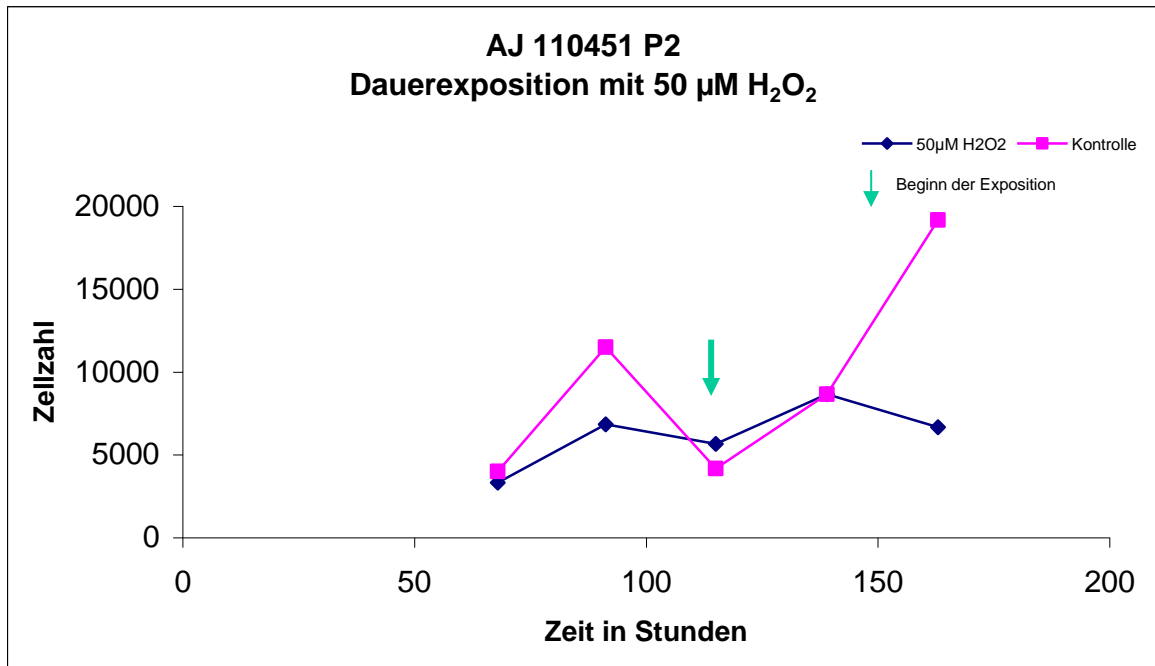
8.2. Diagramme einer dauerhaften Exposition mit H₂O₂

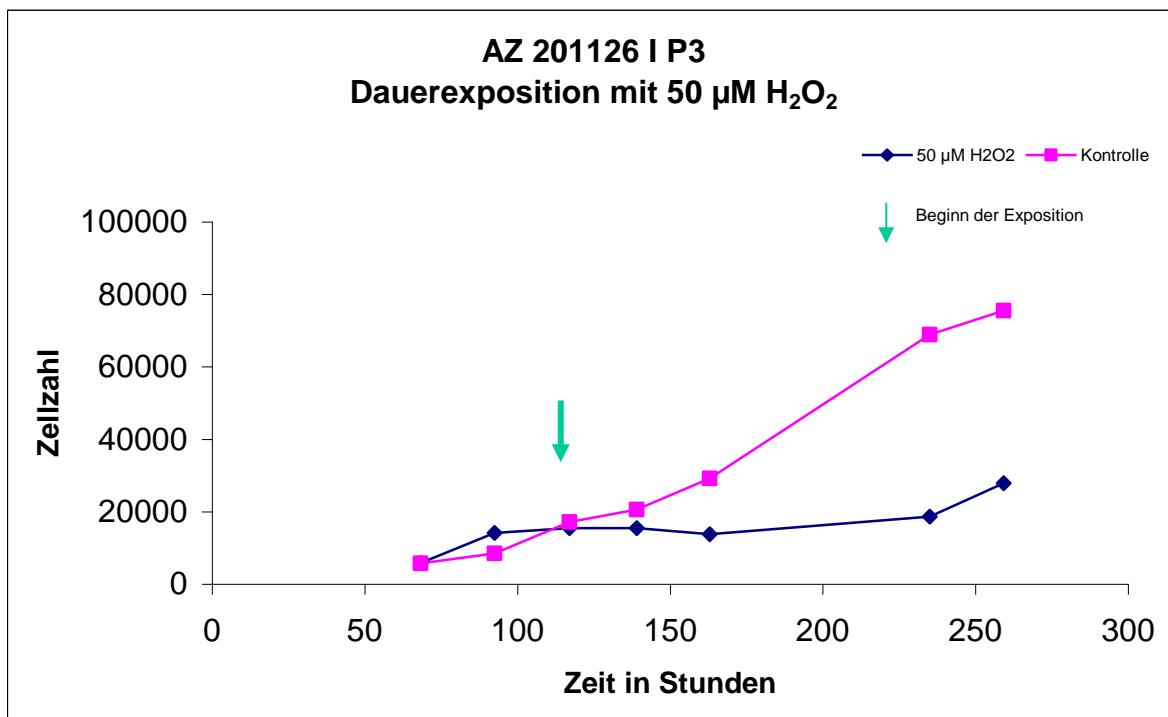
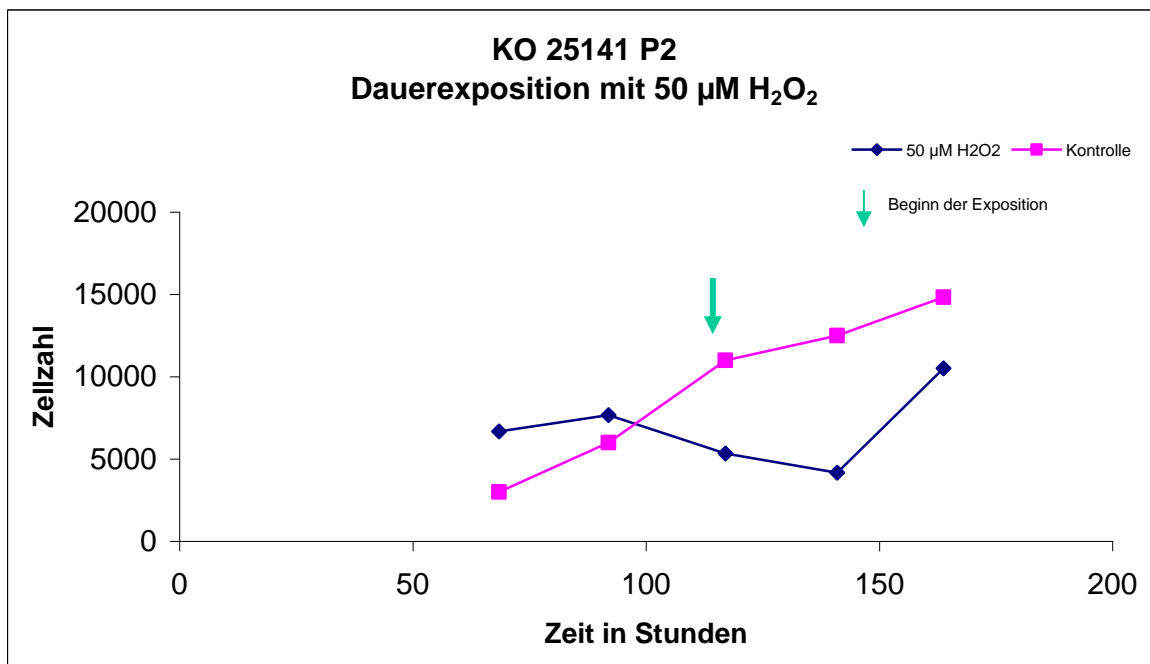
8.2.1 10 µM H₂O₂

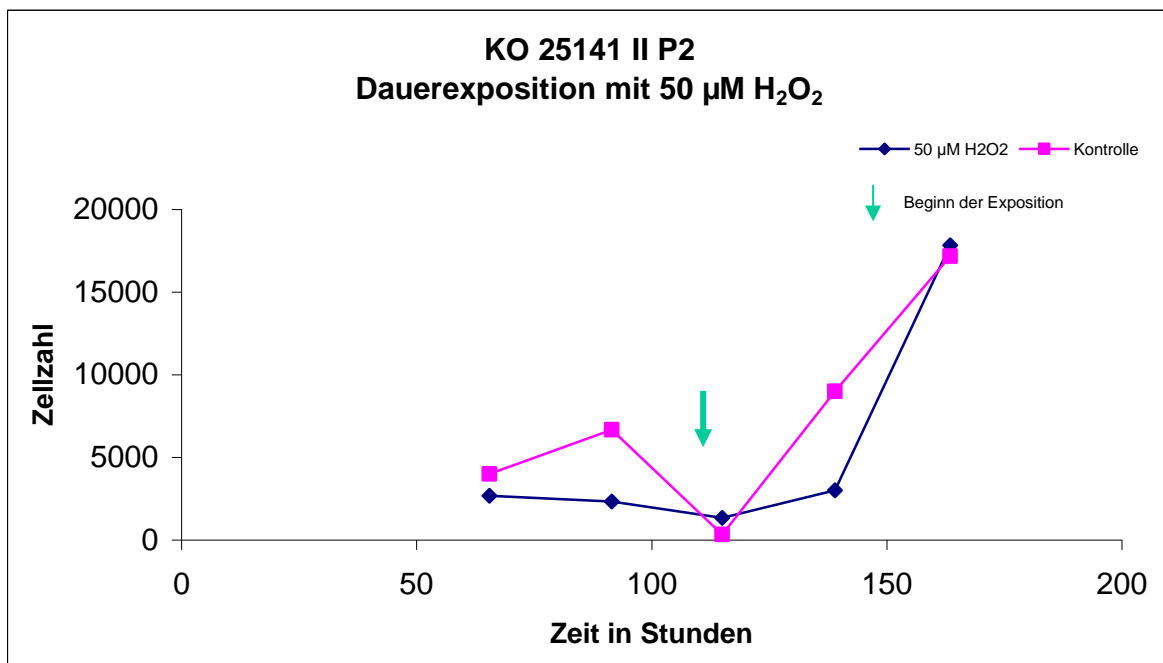
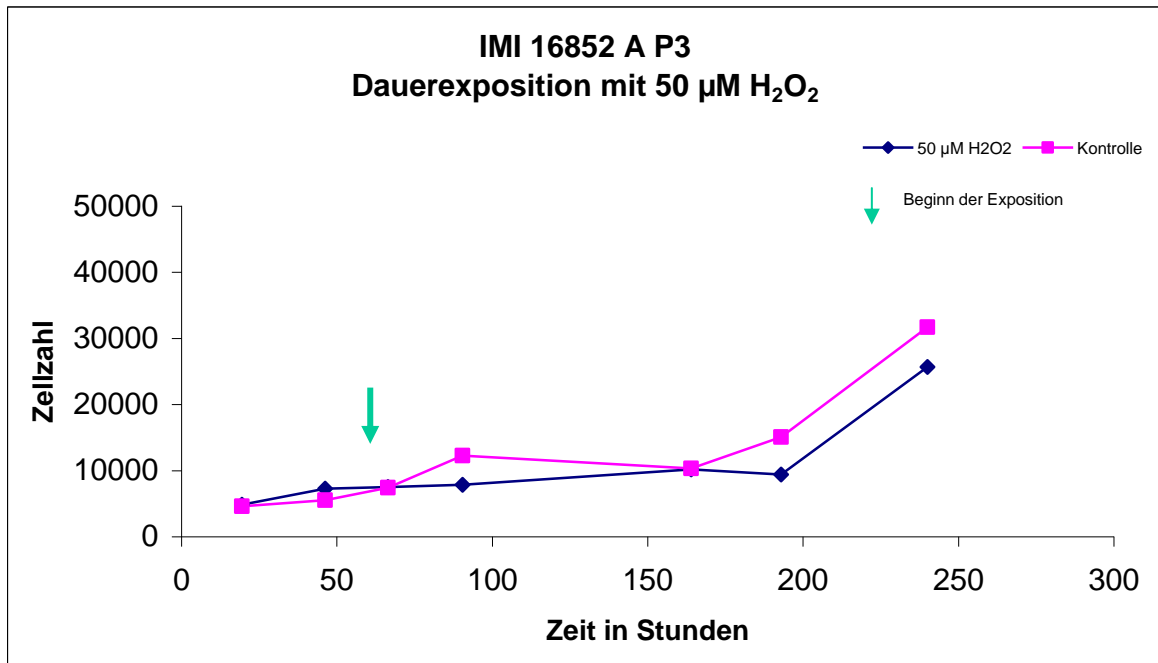


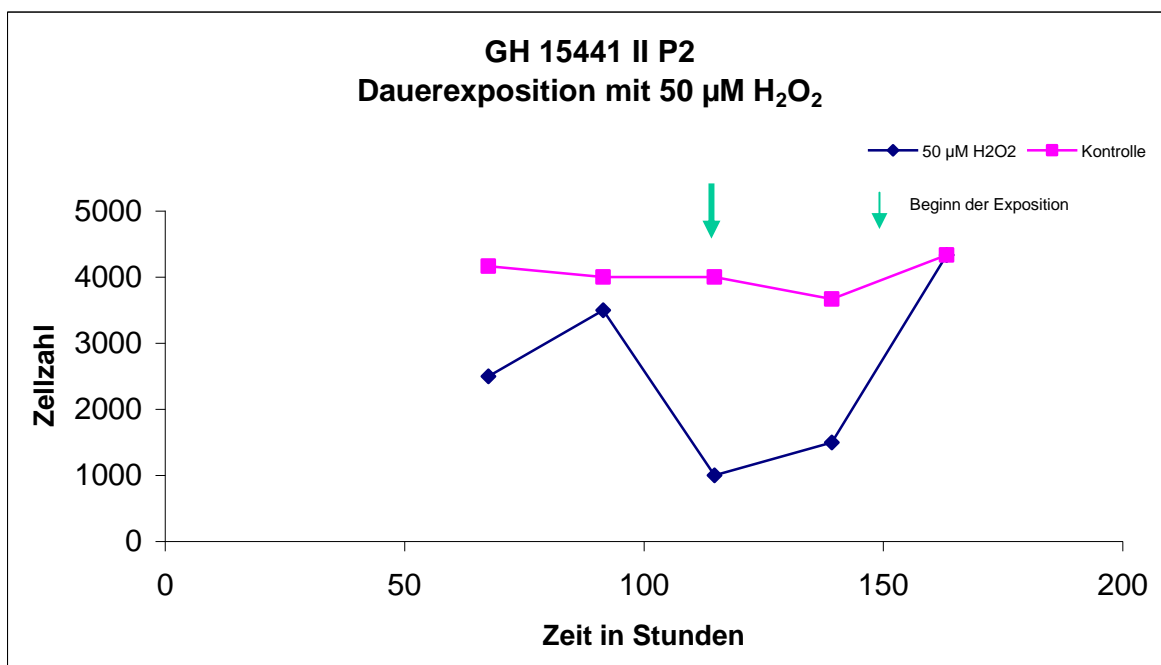
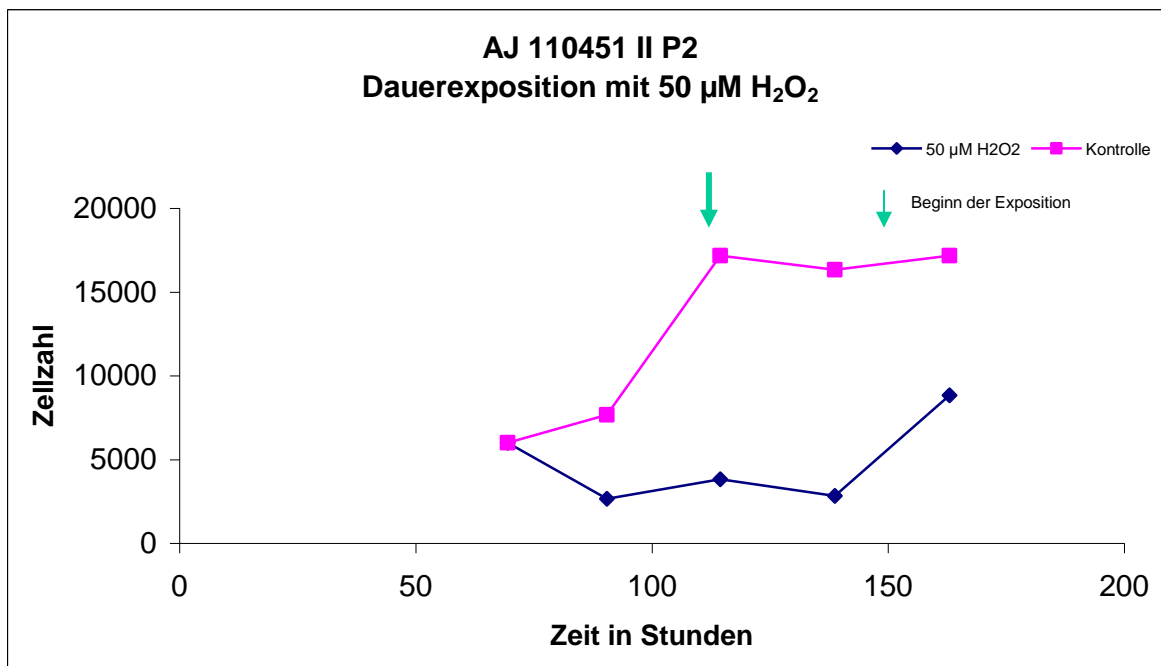


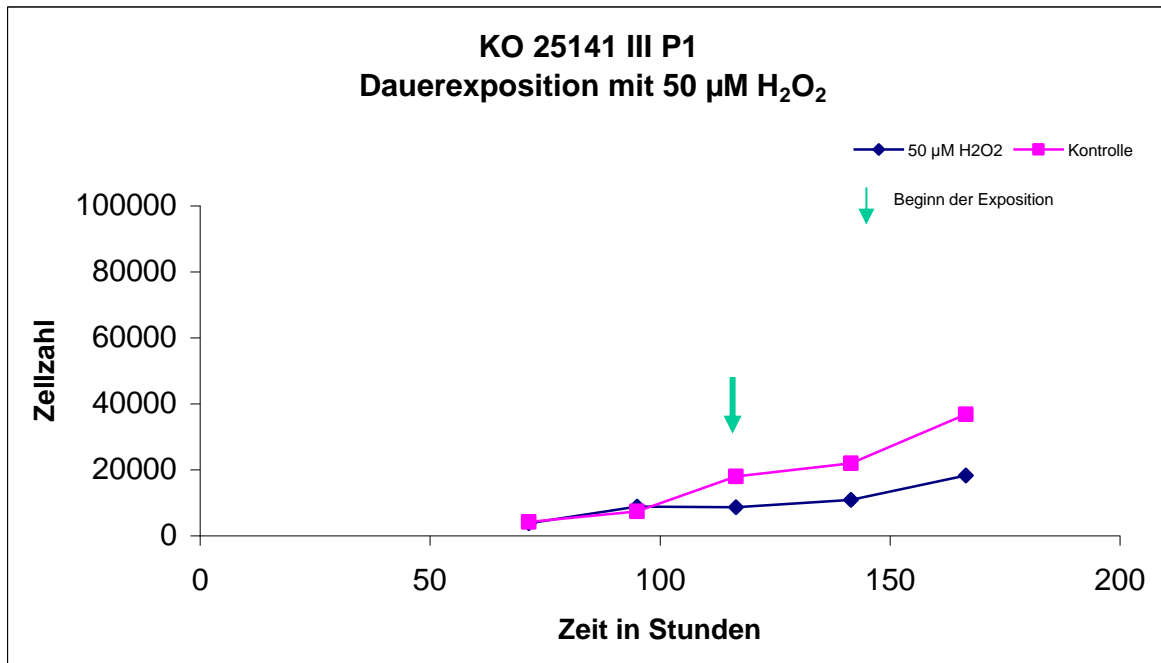
8.2.2. 50 μM H_2O_2



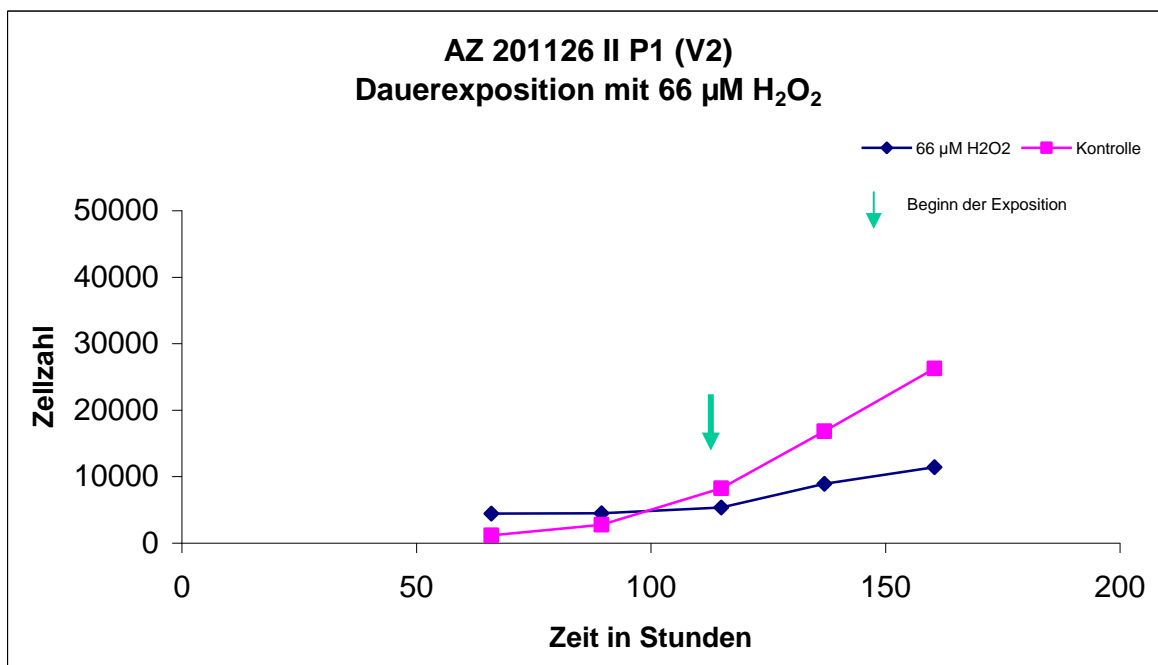
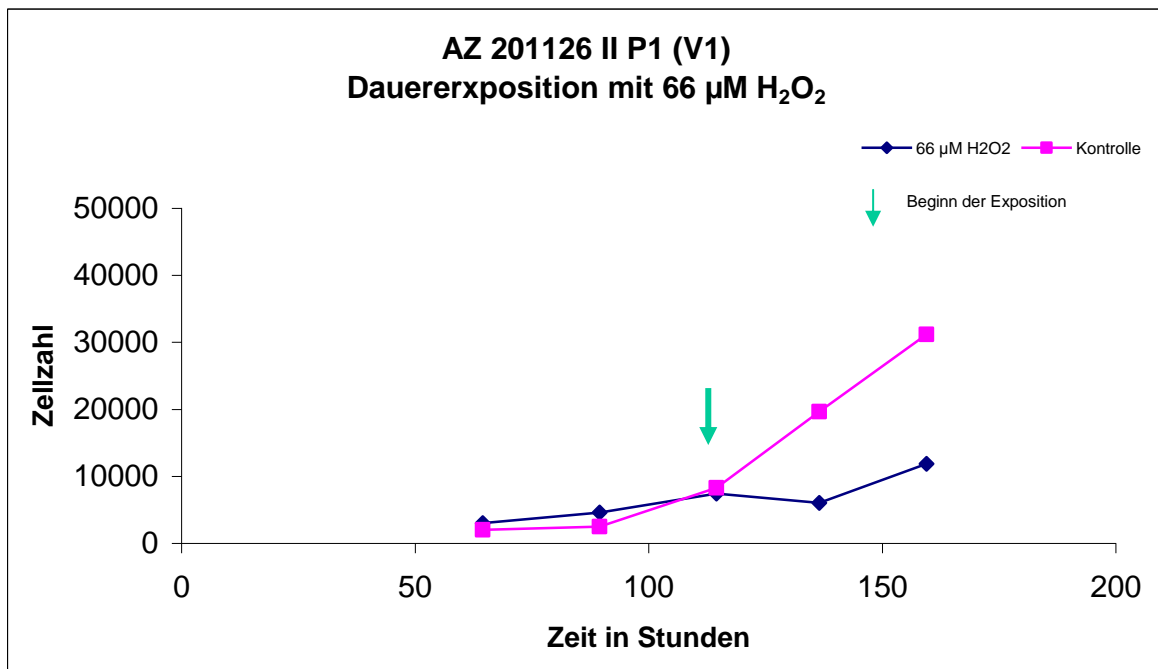


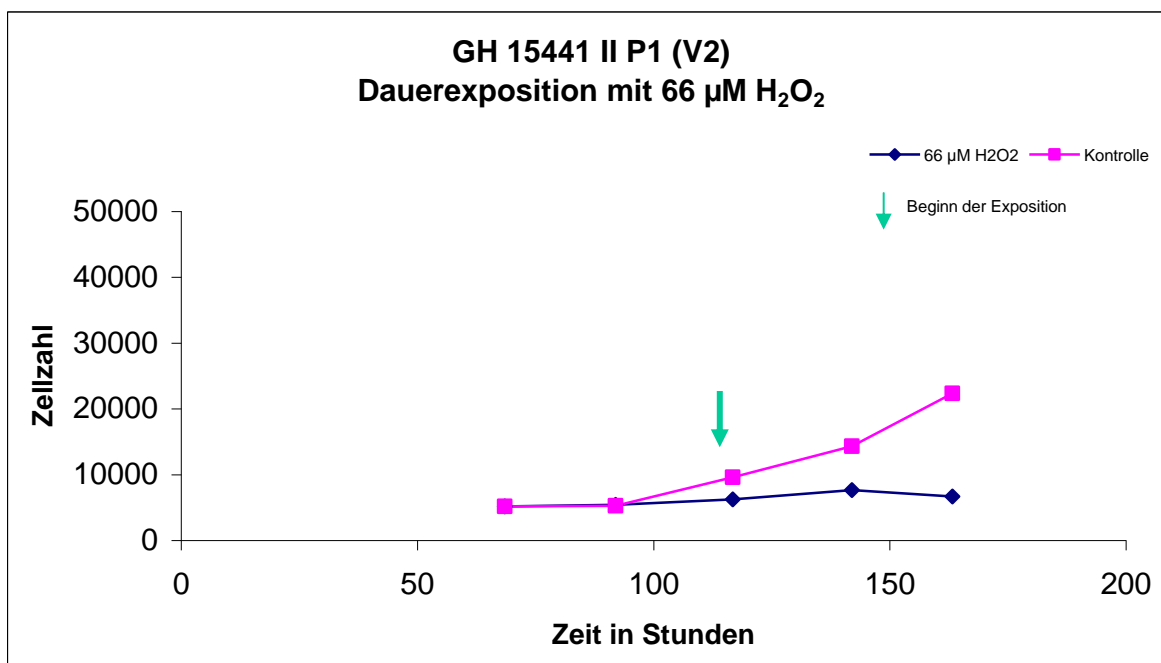
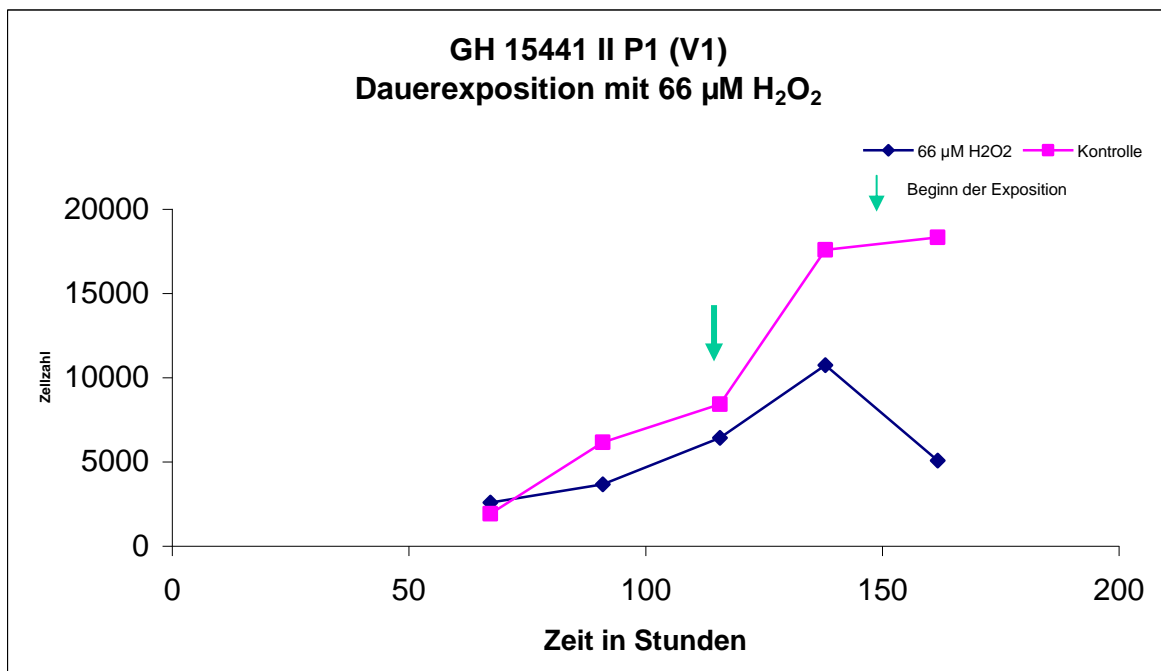




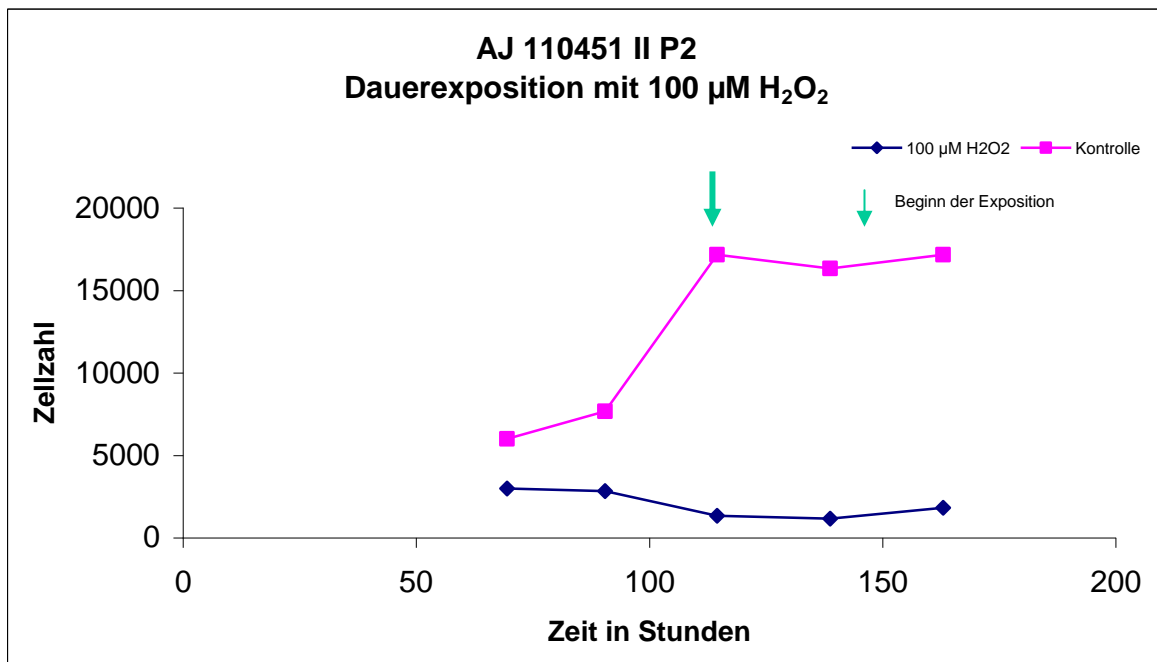
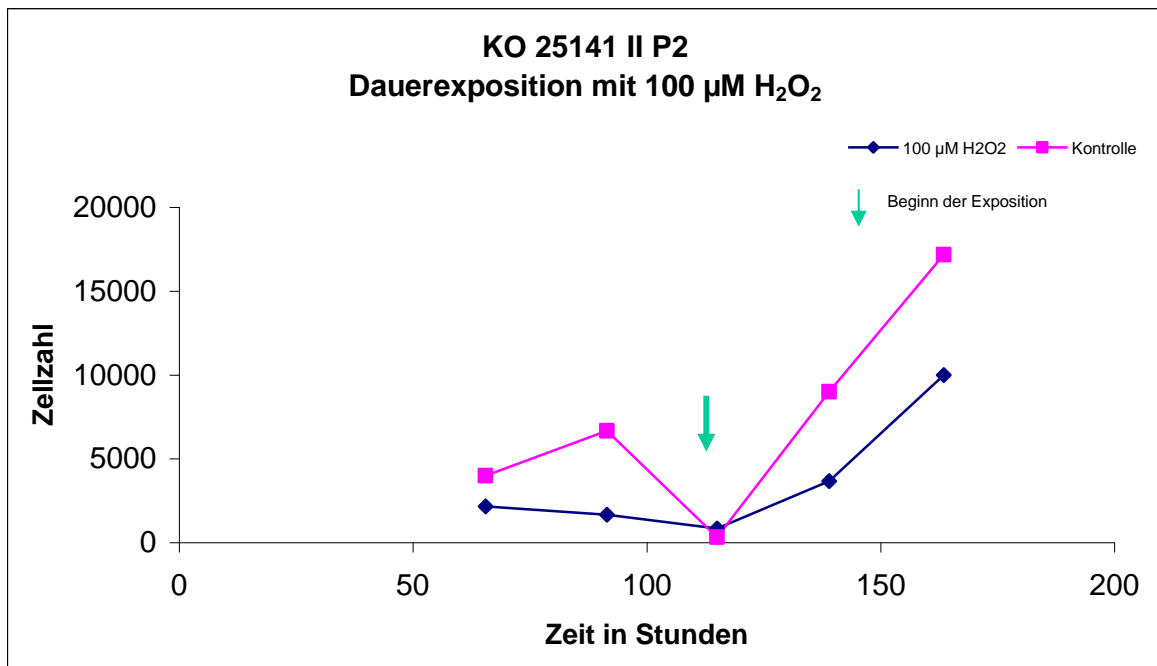


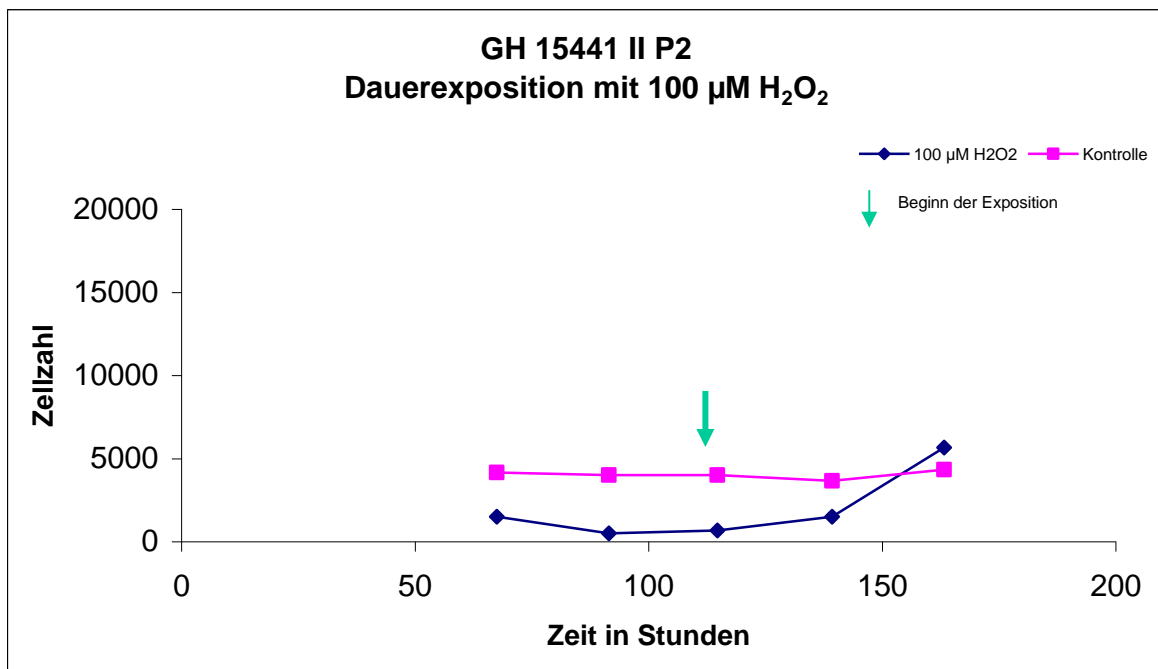
8.2.3. 66µM H₂O₂



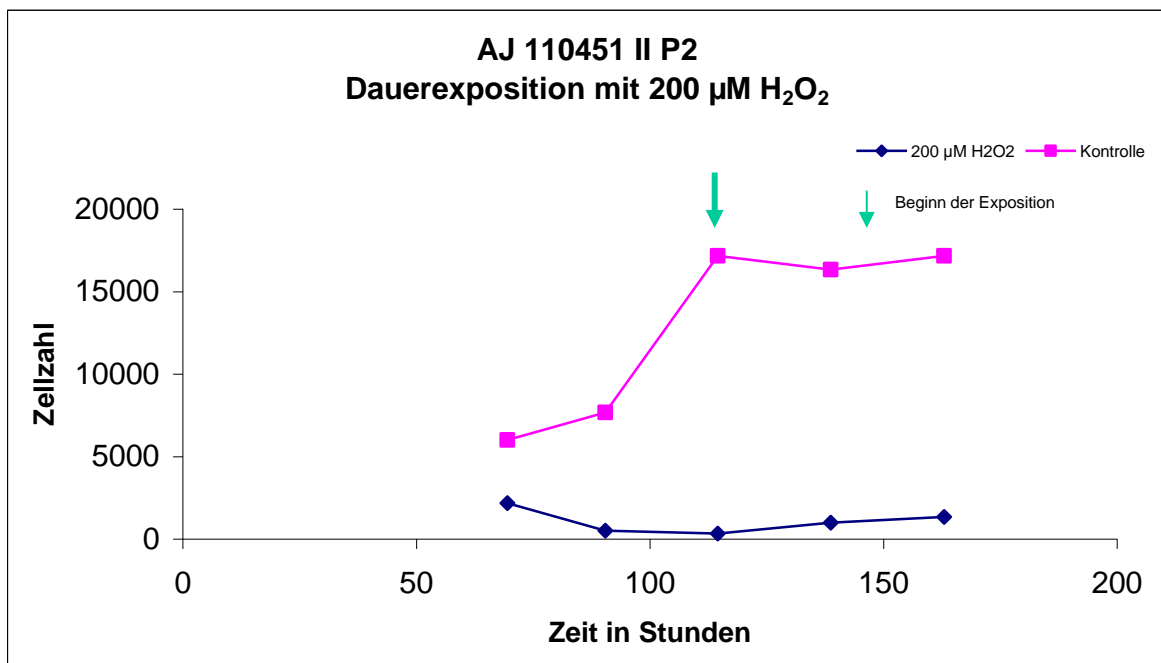
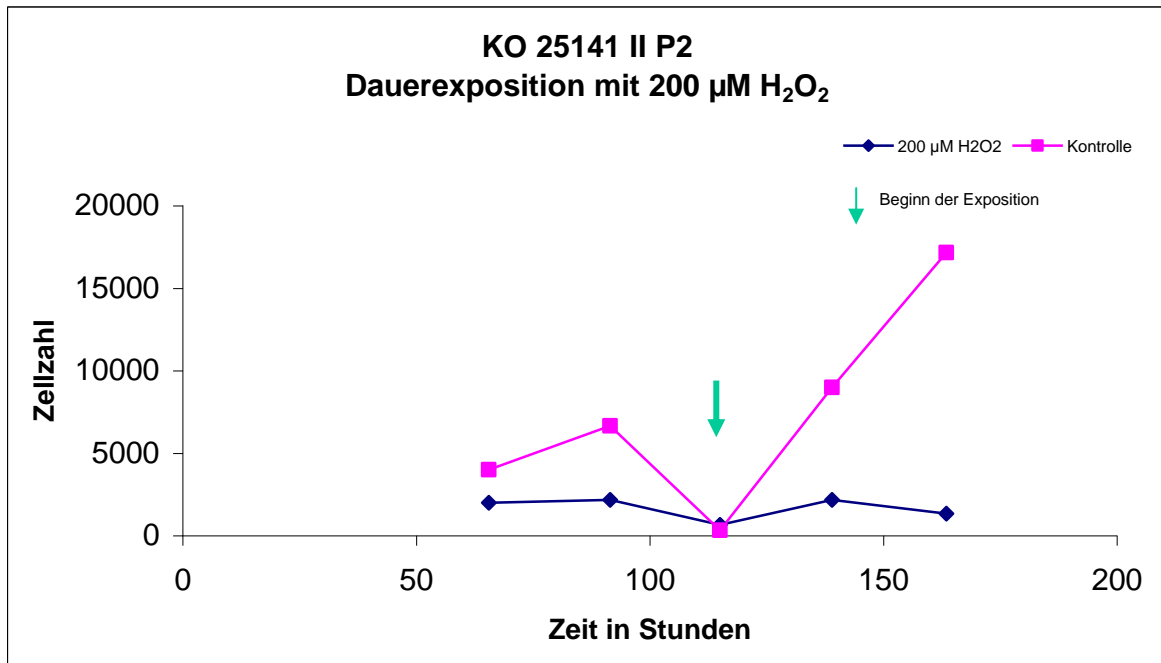


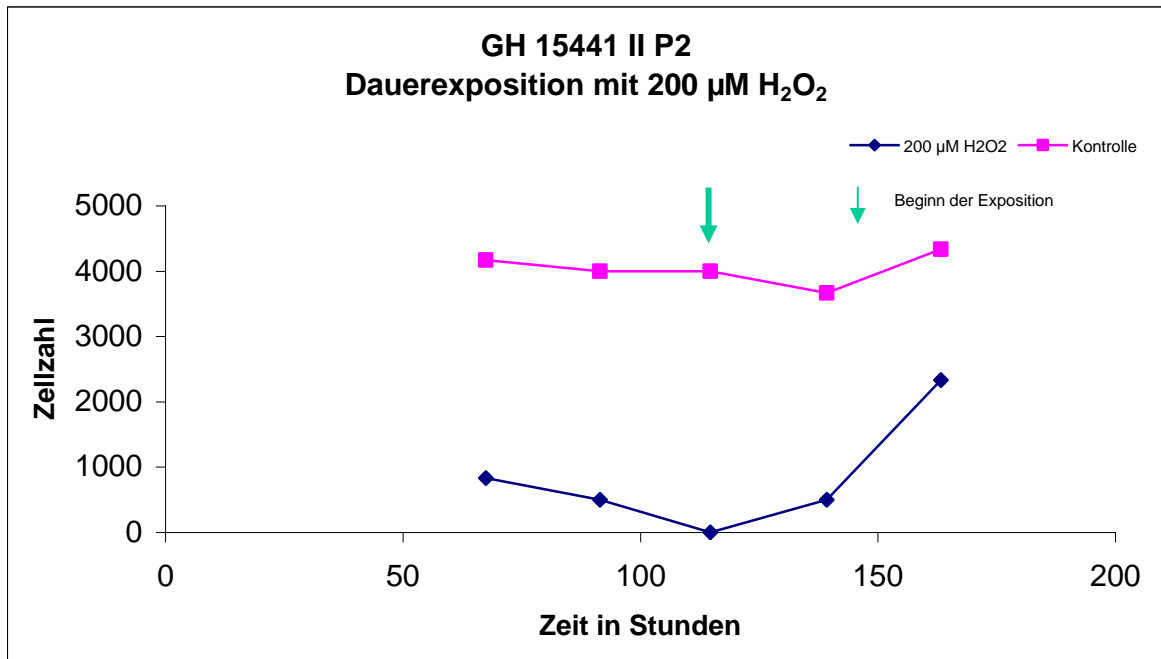
8.2.4. 100µM H₂O₂





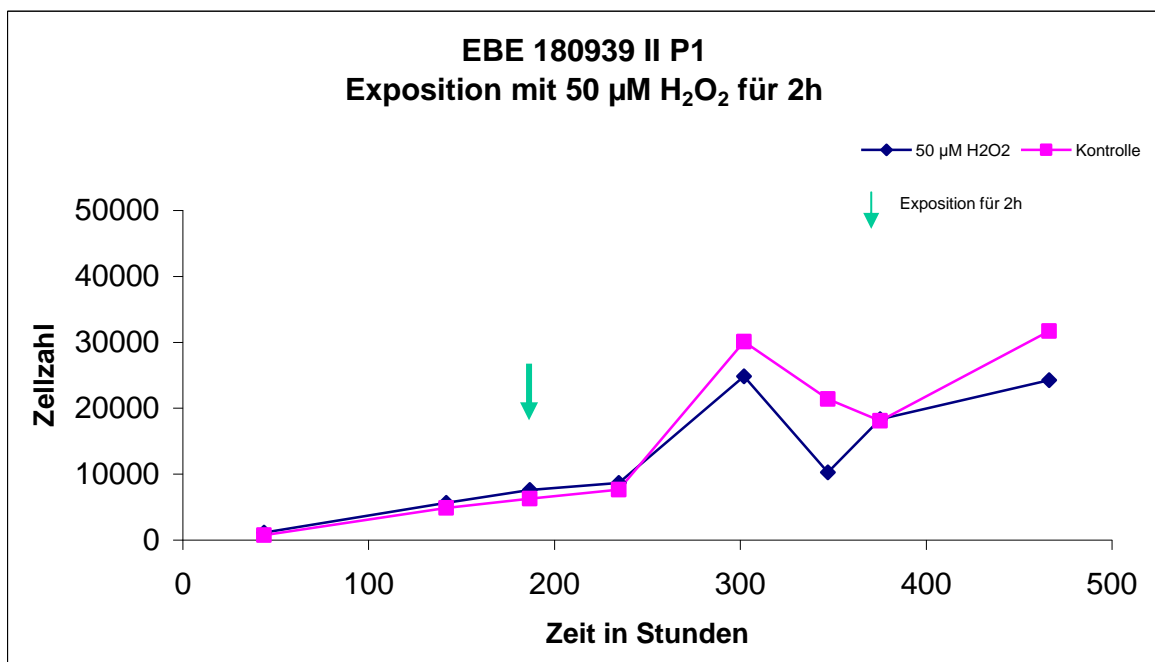
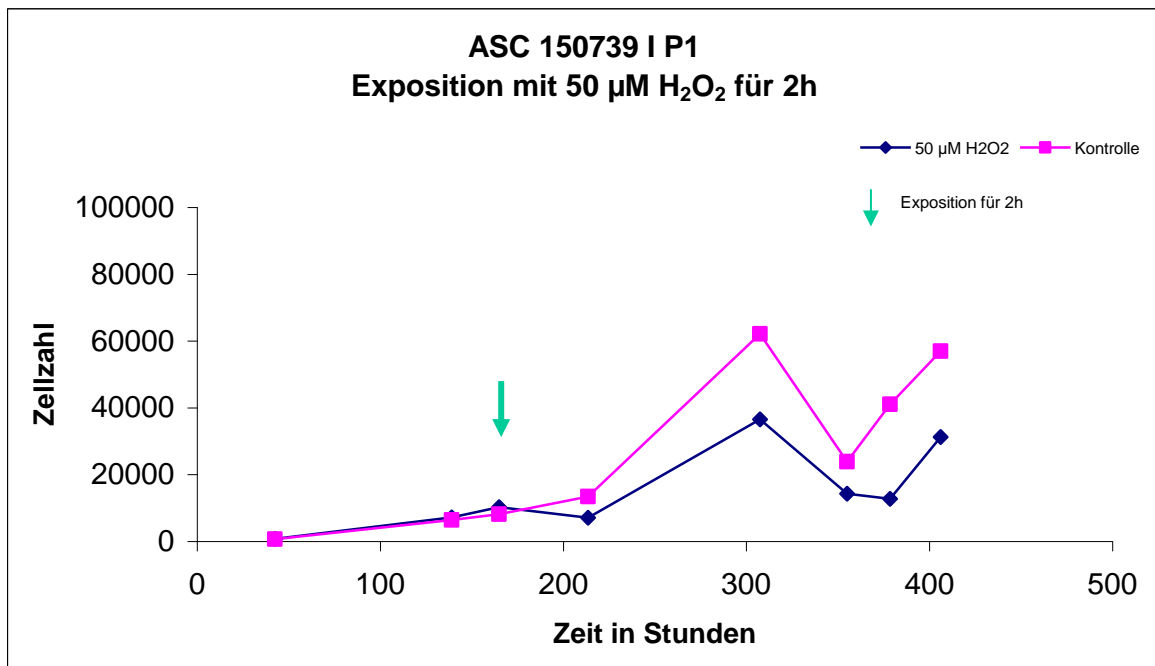
8.2.5. 200µM H₂O₂

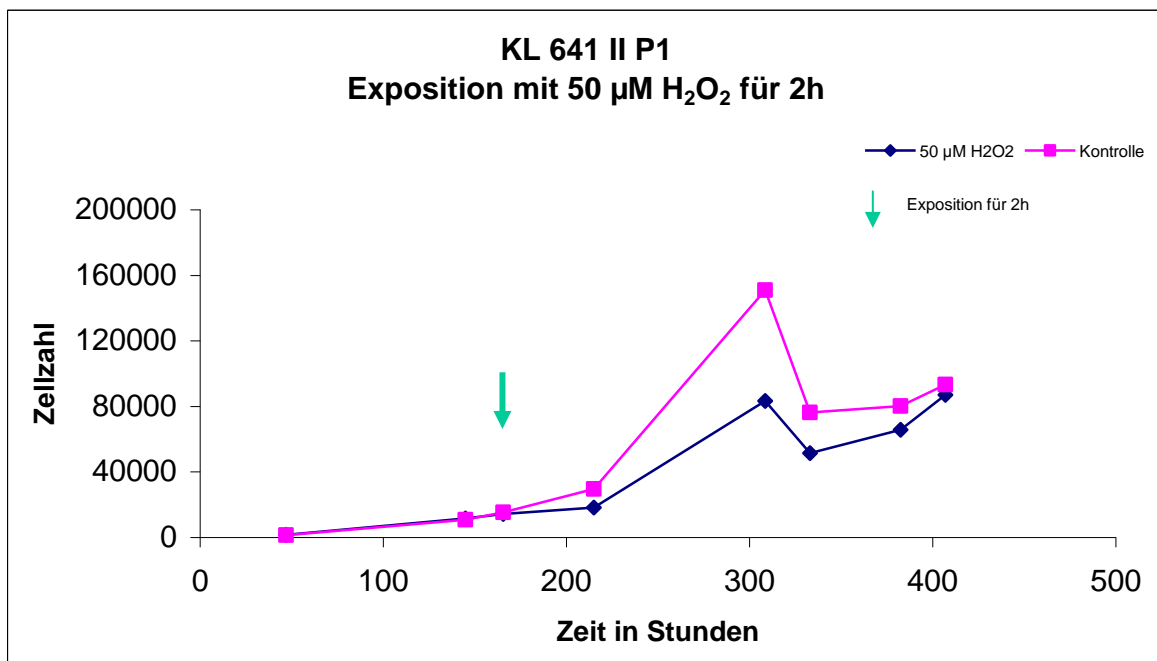
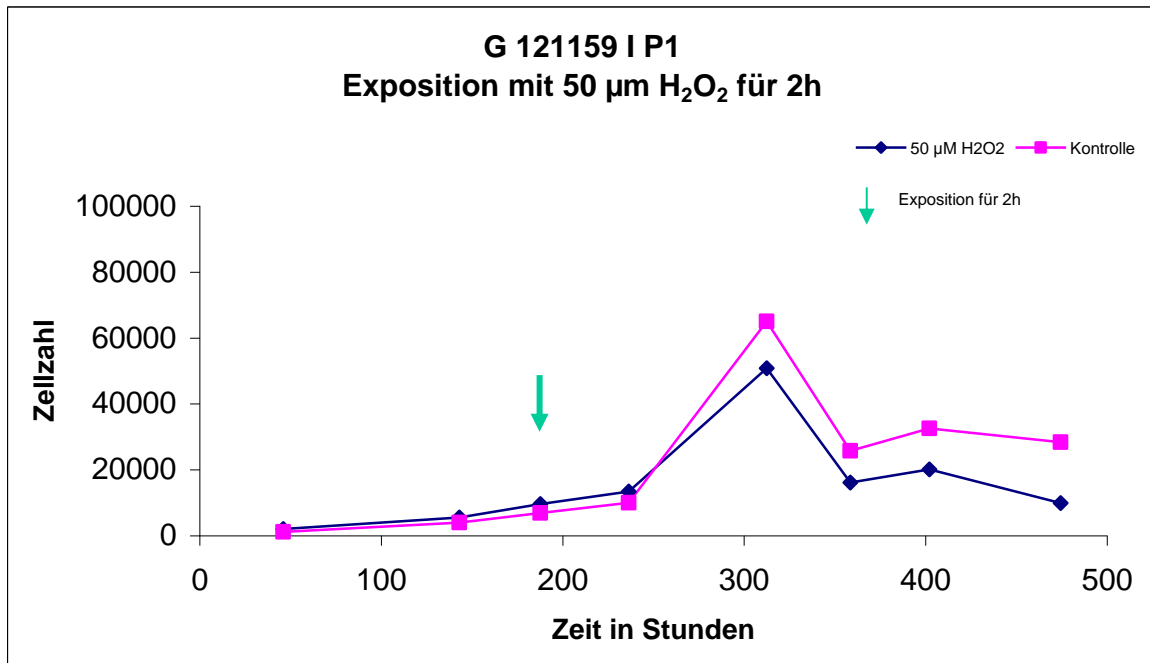


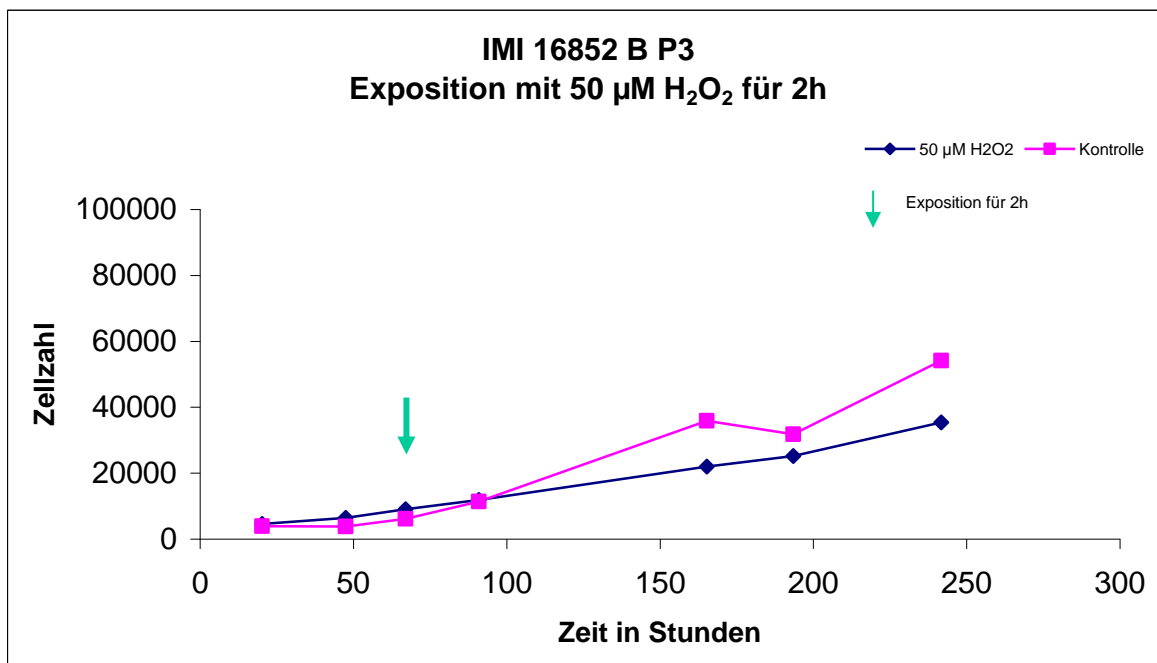
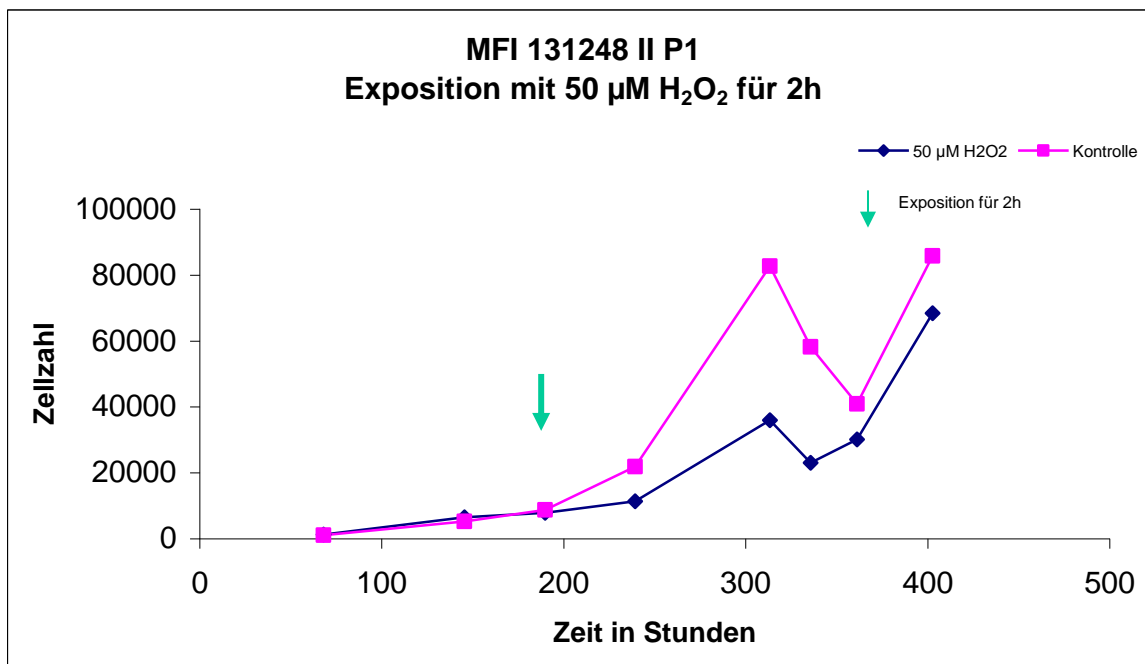


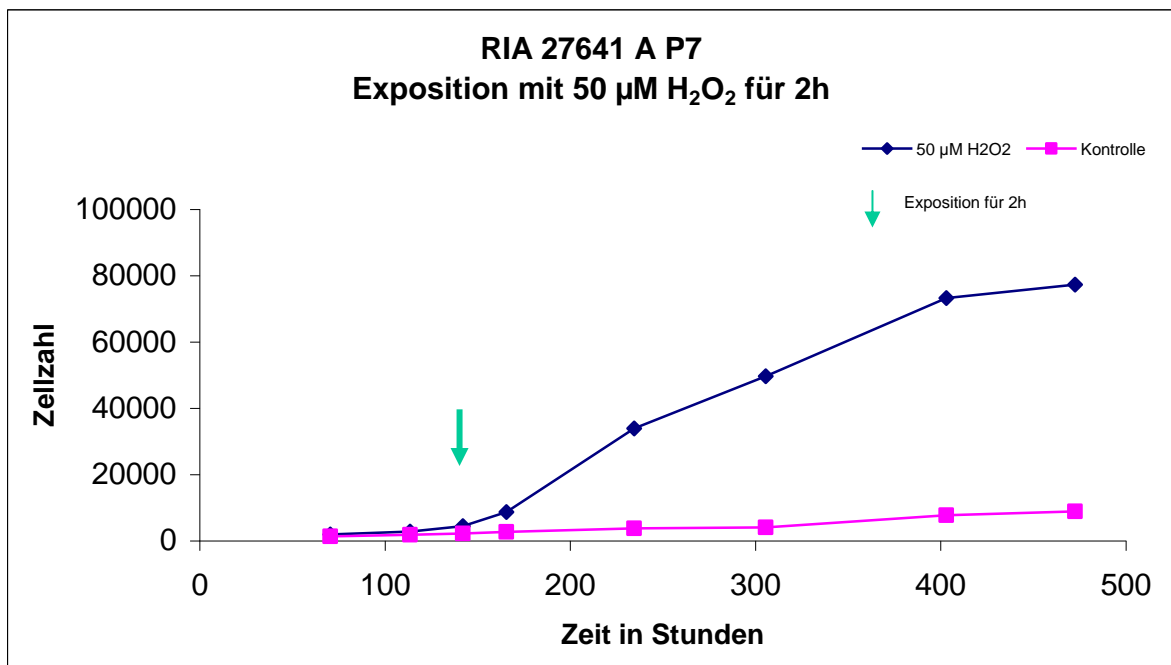
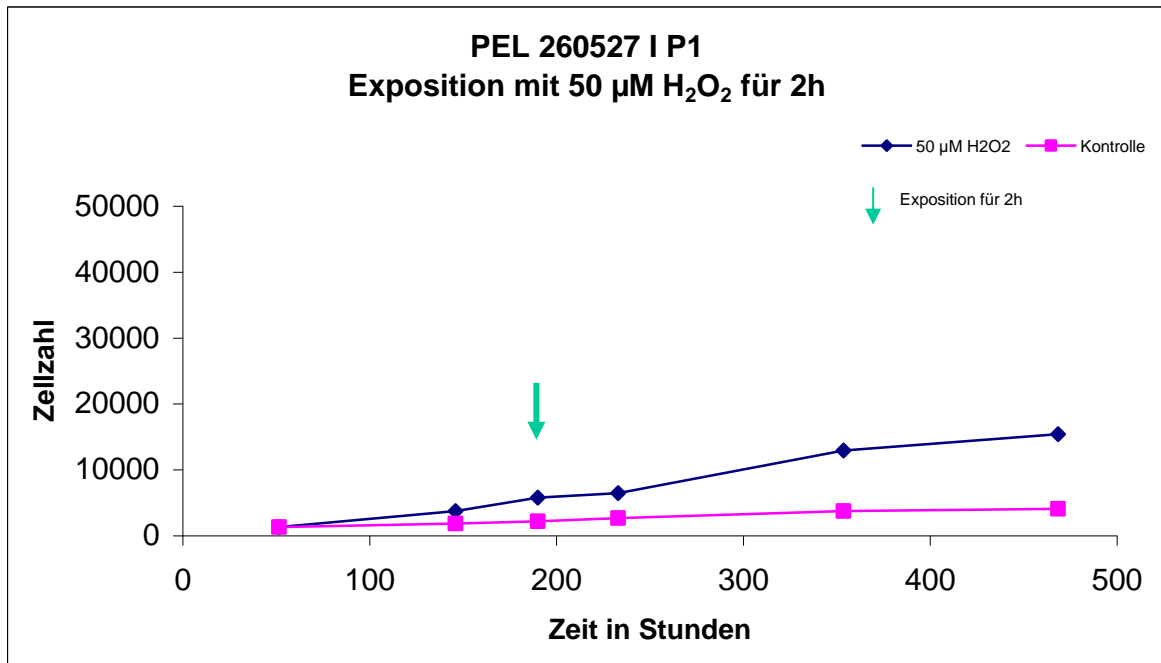
8.3. Diagramme einer temporären Exposition mit H₂O₂

8.3.1. 50µM H₂O₂

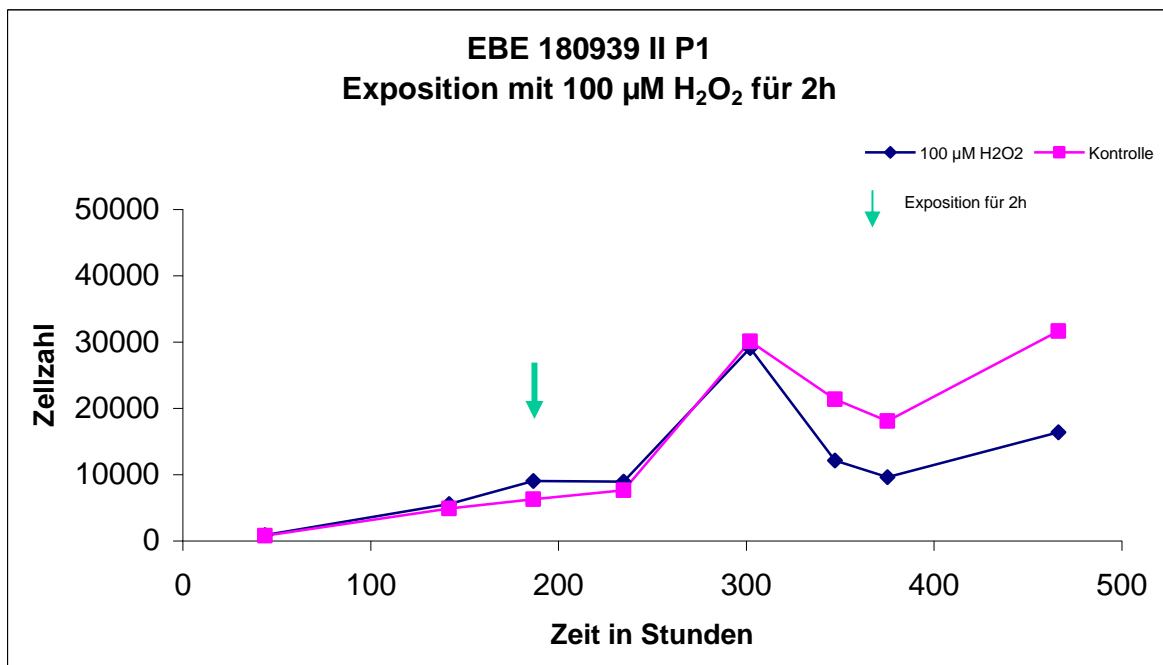
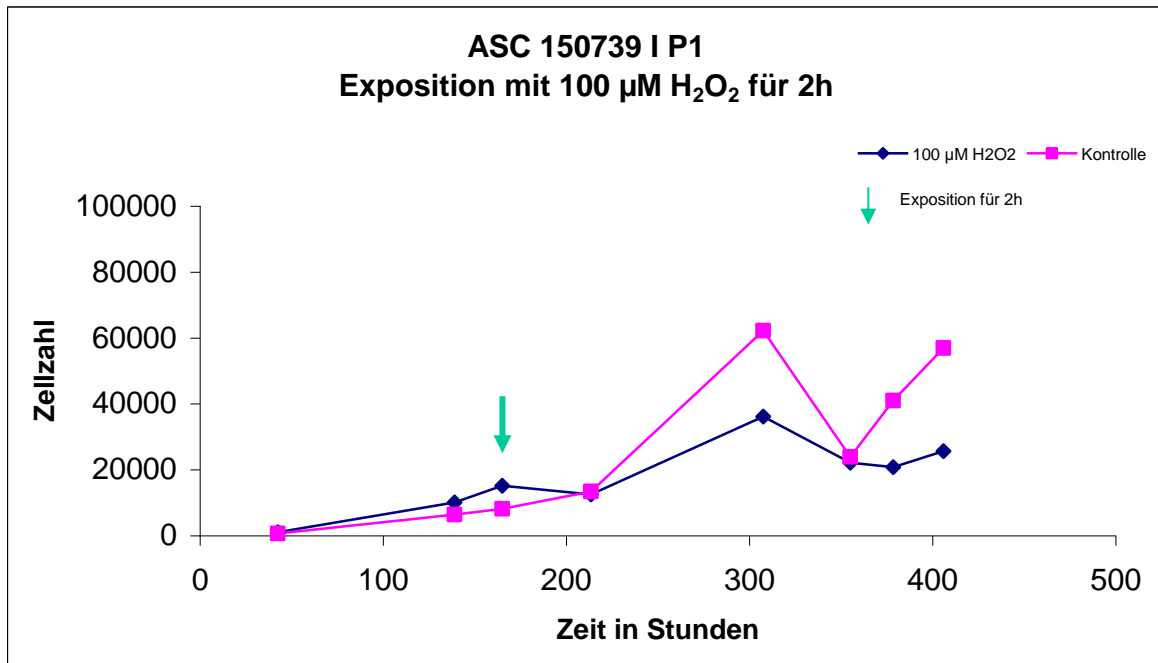


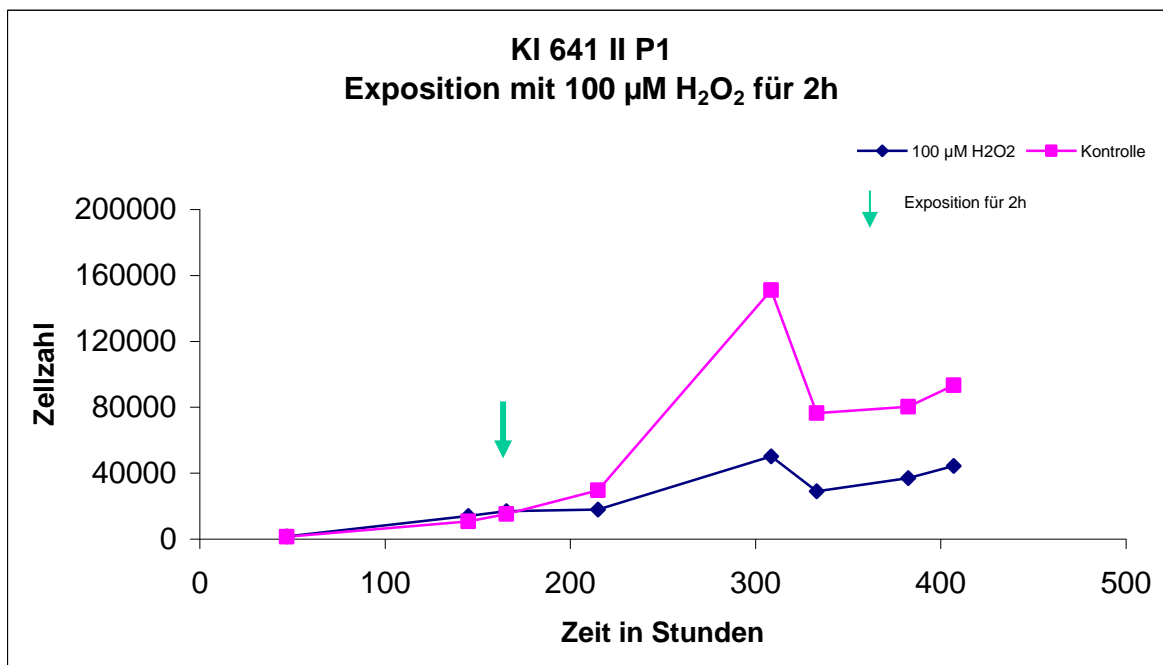
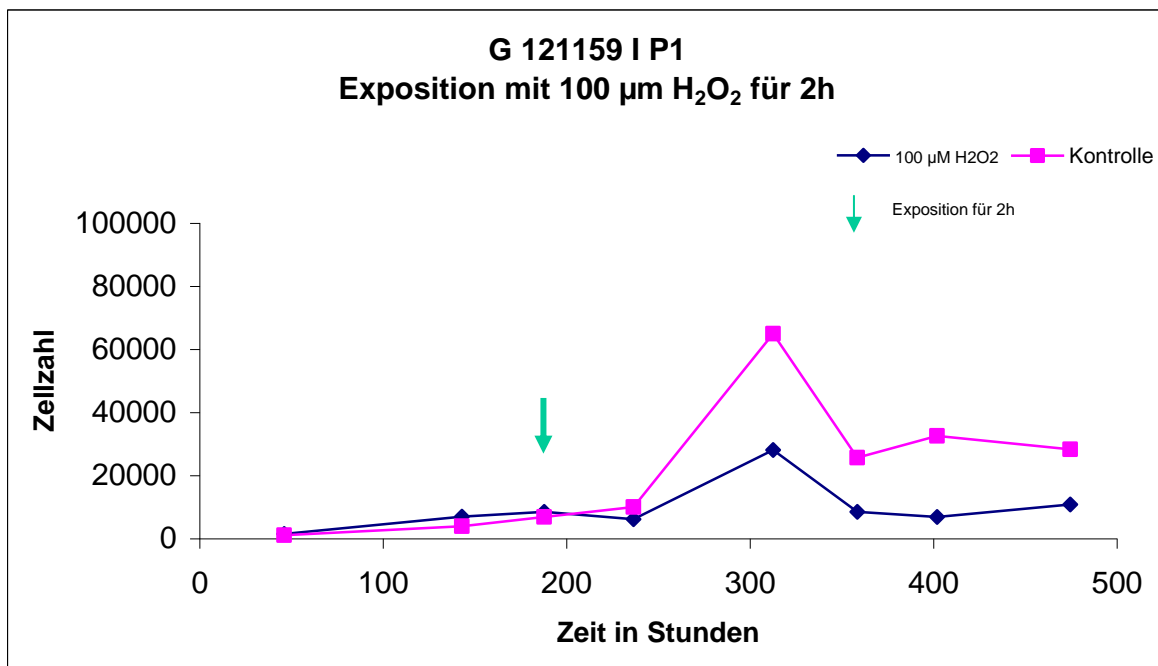


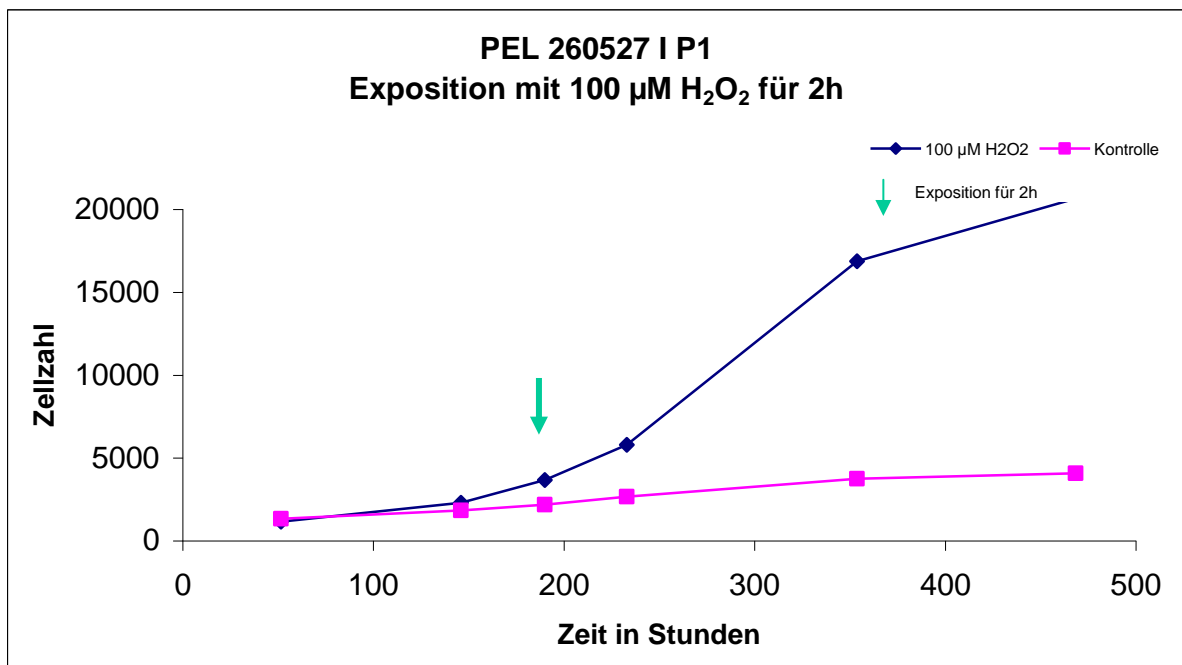
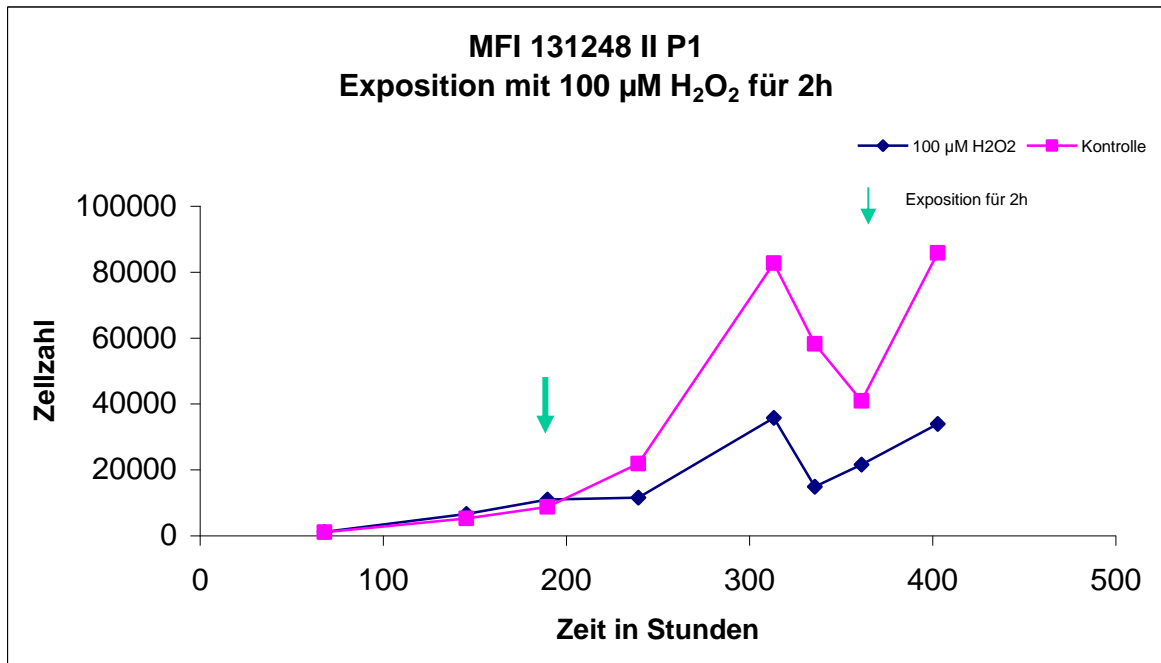


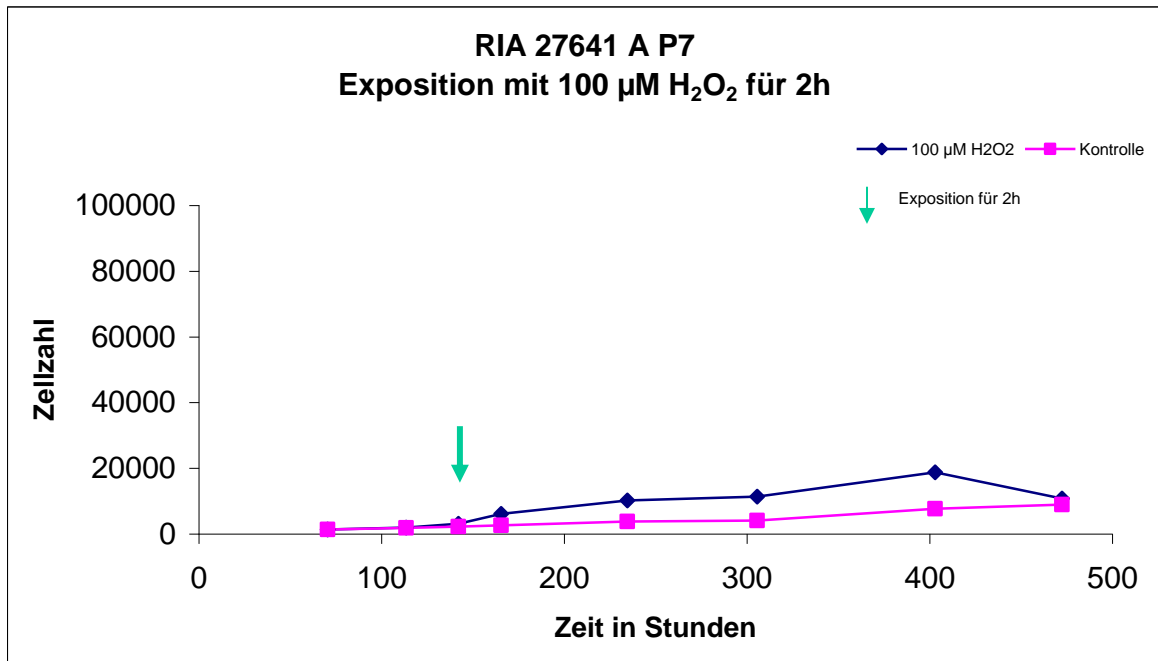


8.3.2. 100µM H₂O₂



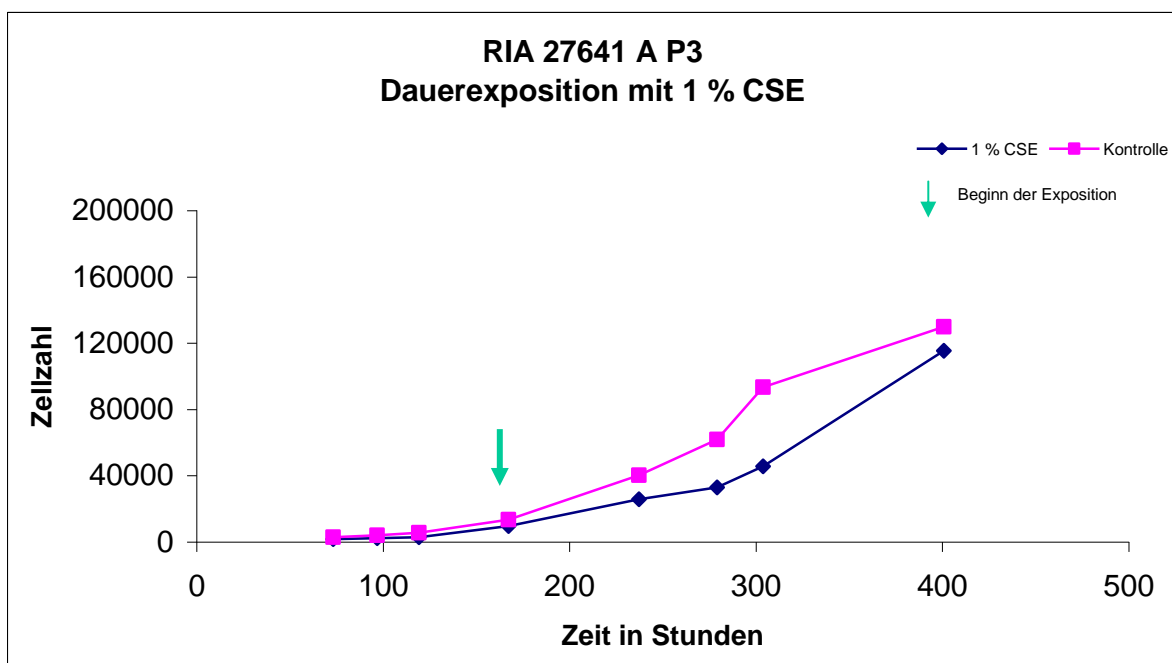
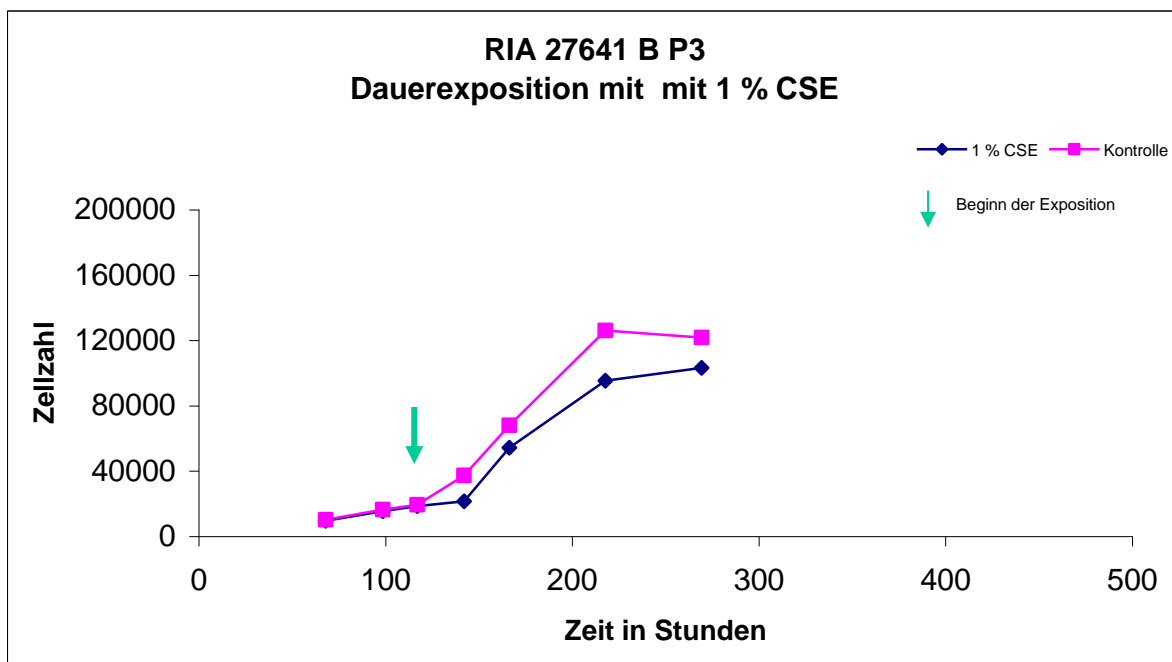


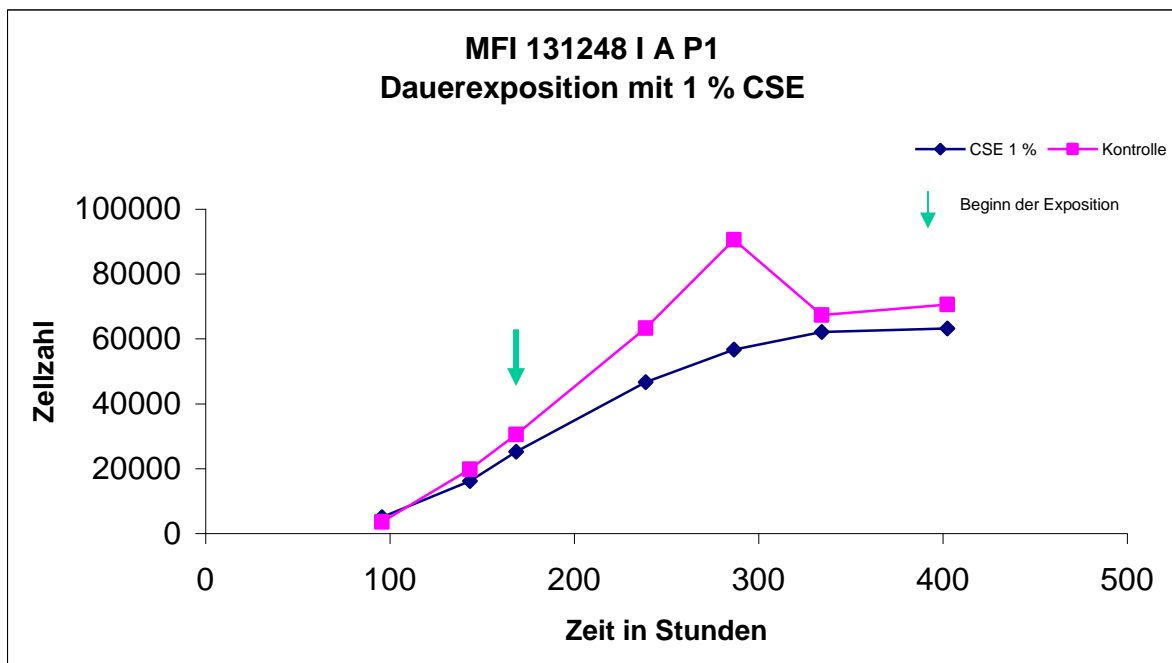
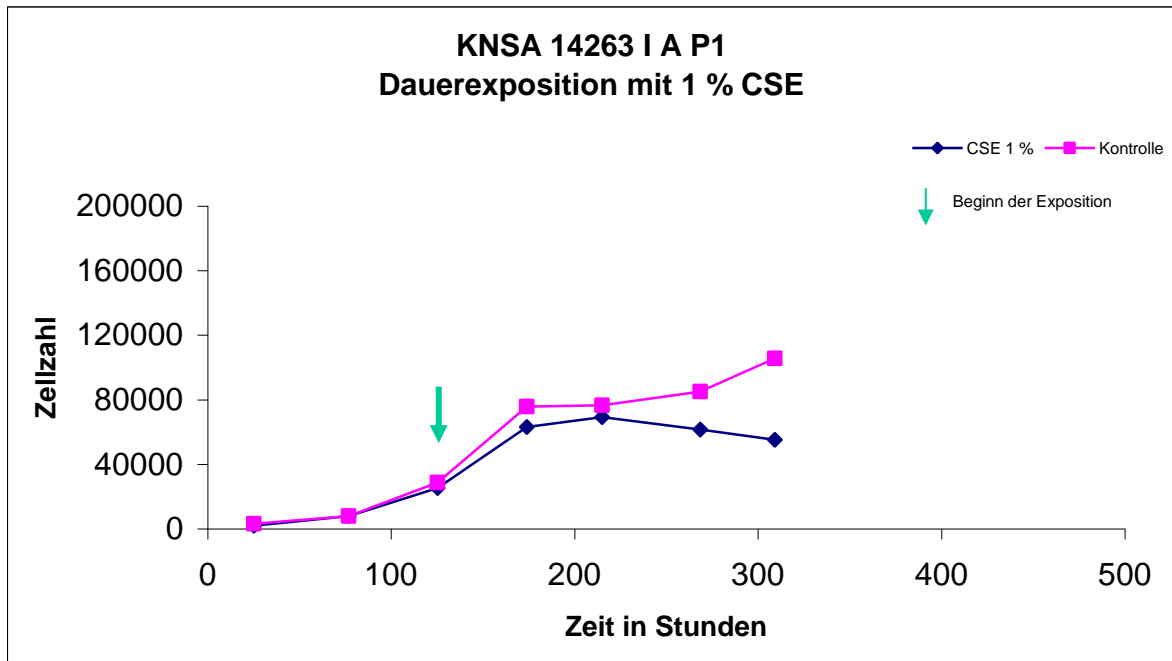


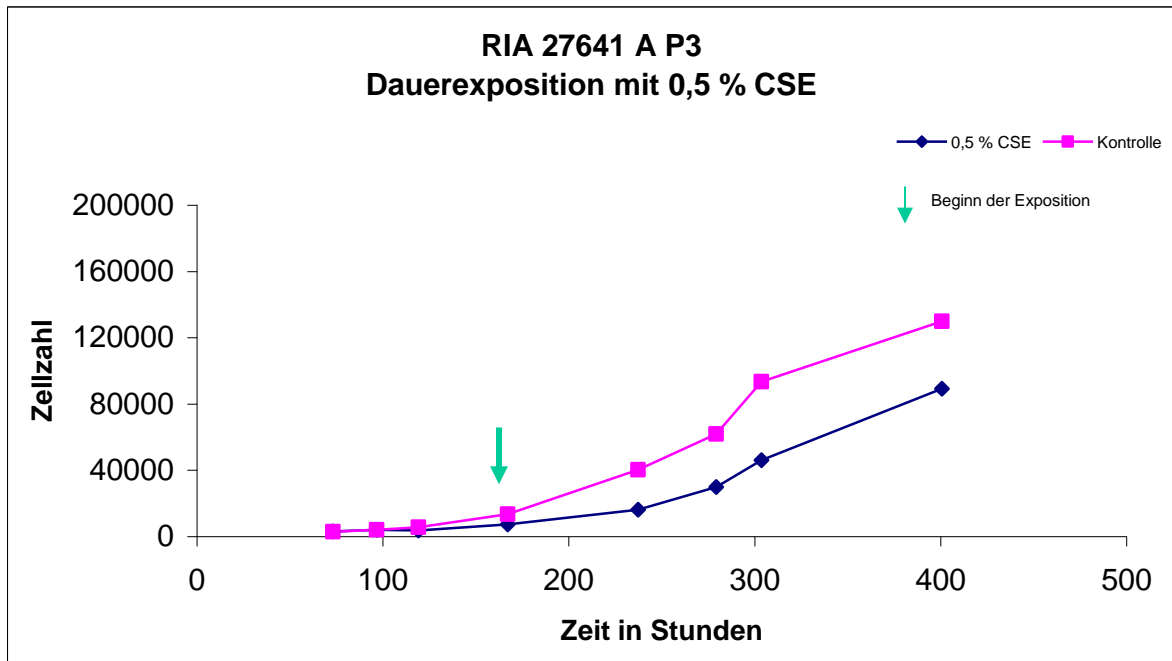


8.4. Diagramme mit CSE in PBS

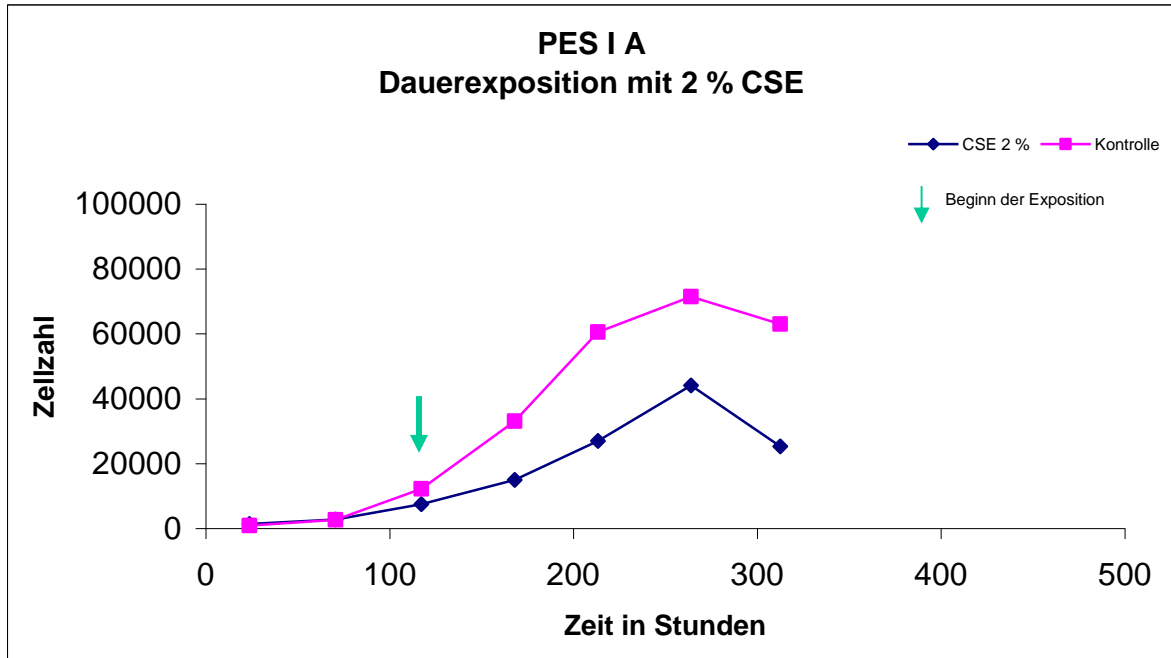
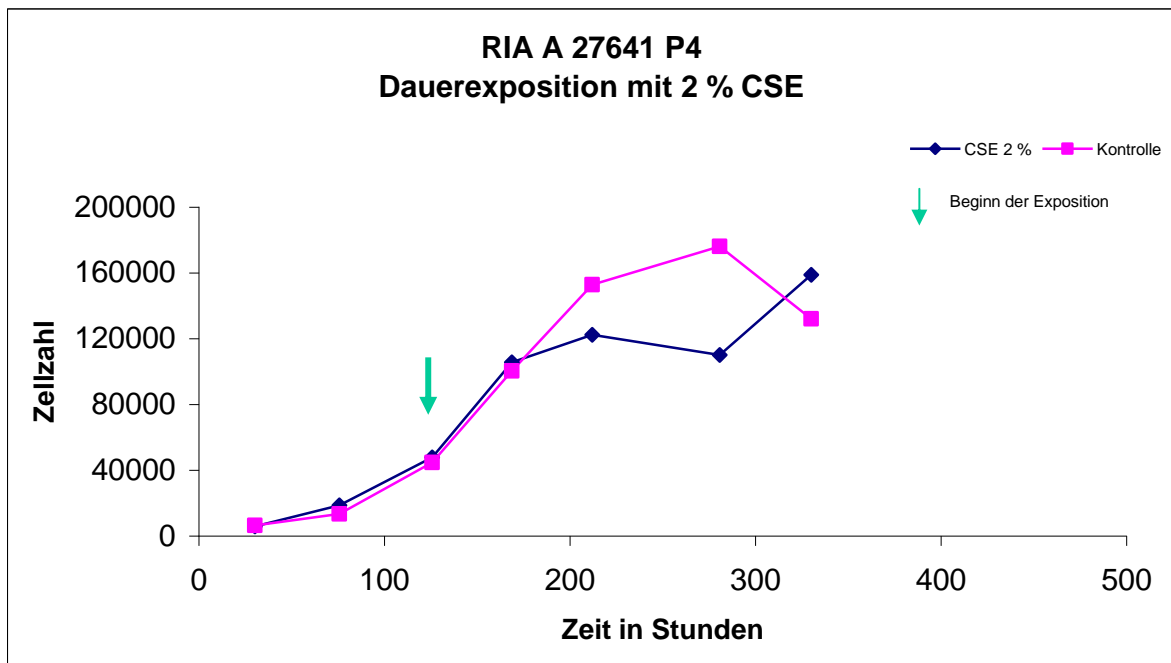
8.4.1. 1% CSE

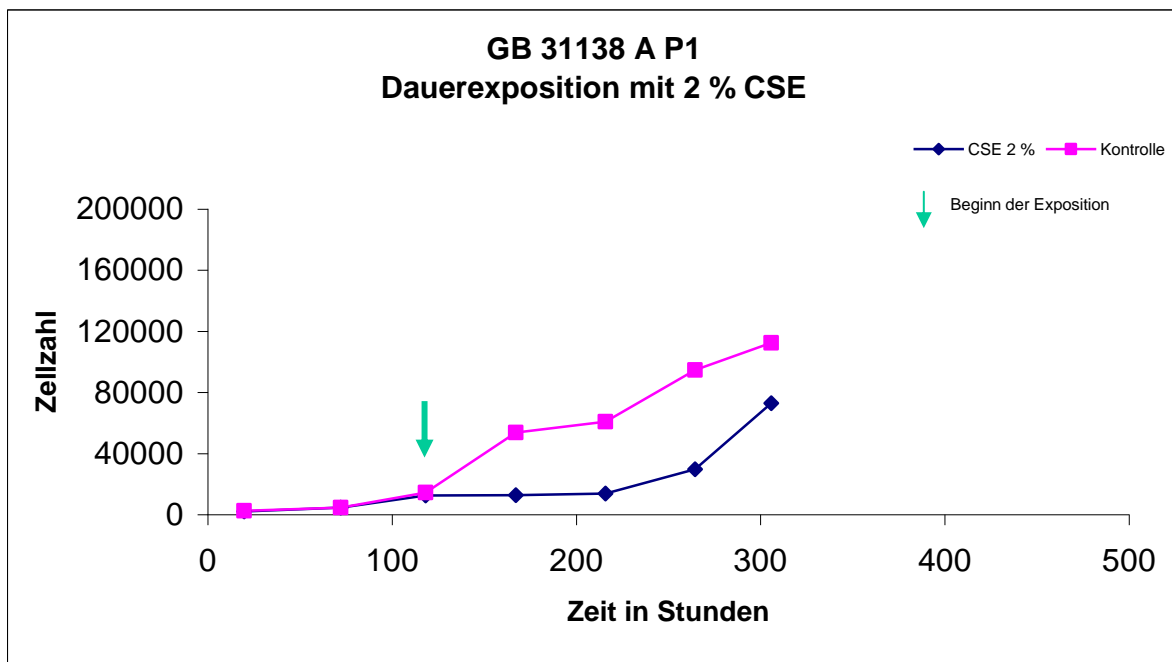




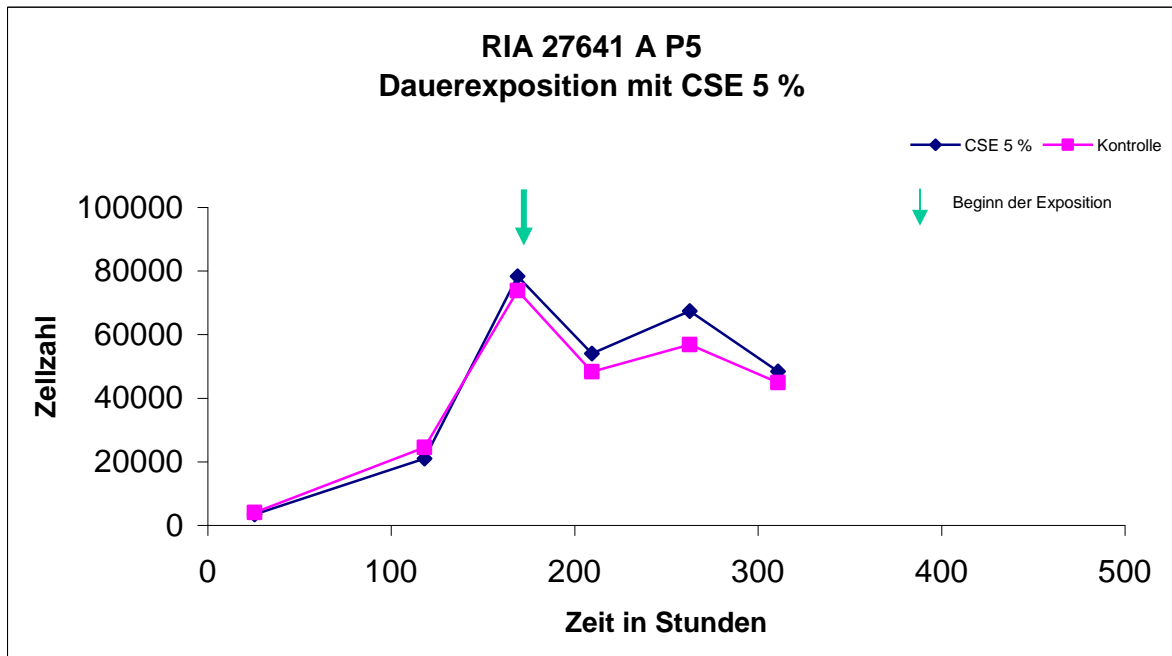
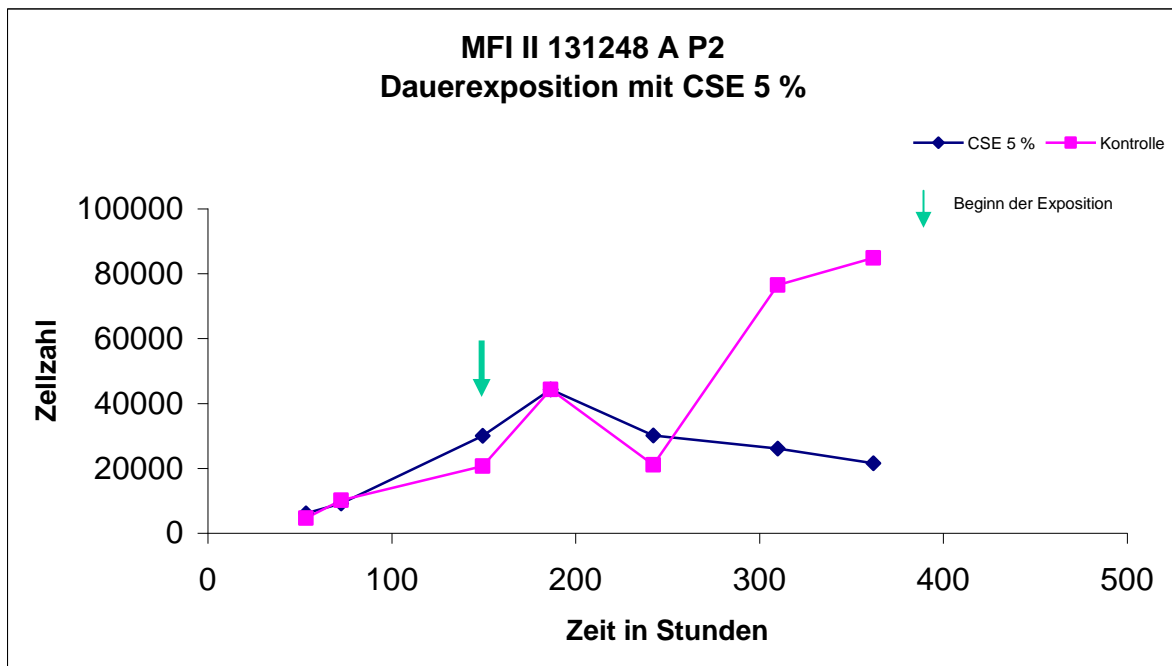


8.4.2 2% CSE

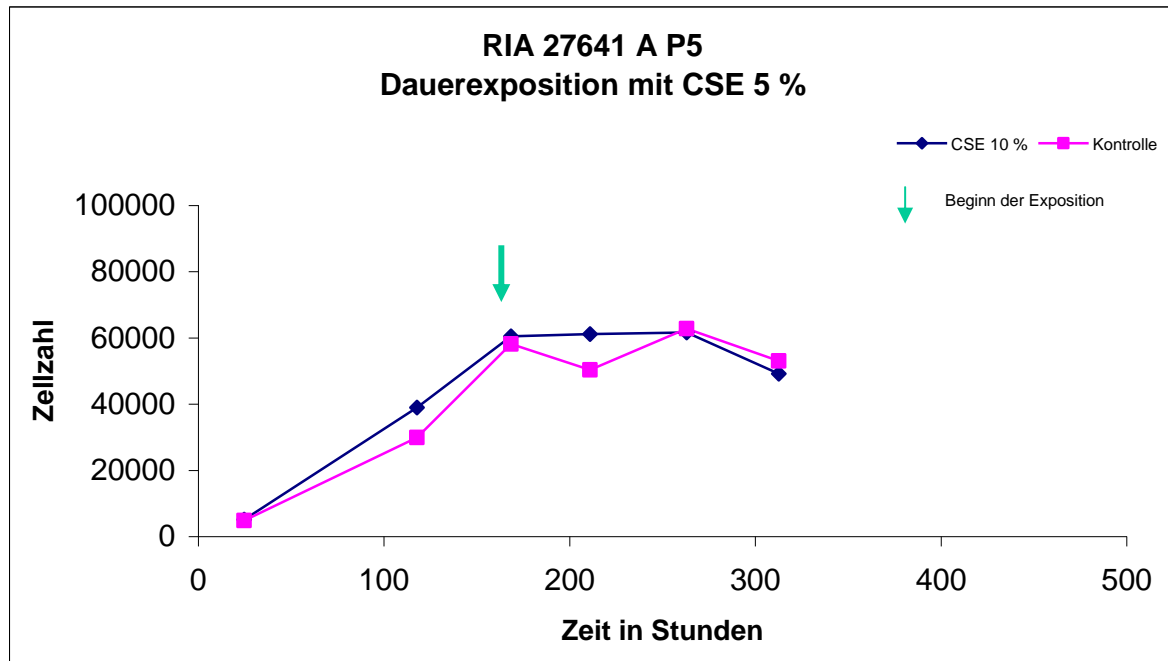




8.4.3. 5% CSE

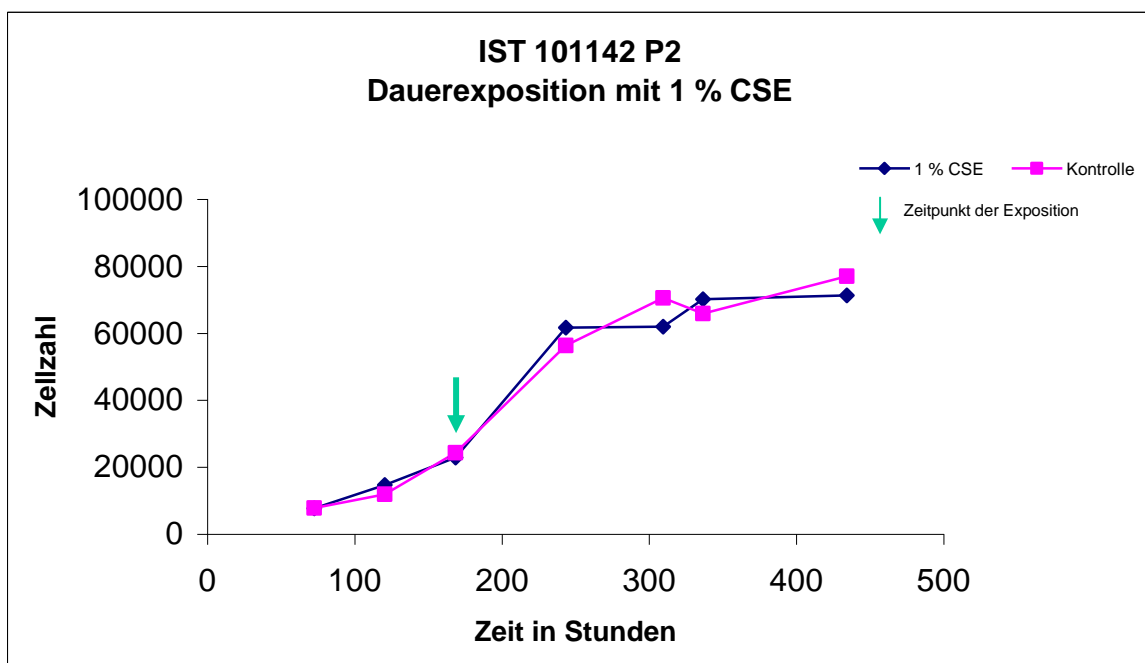
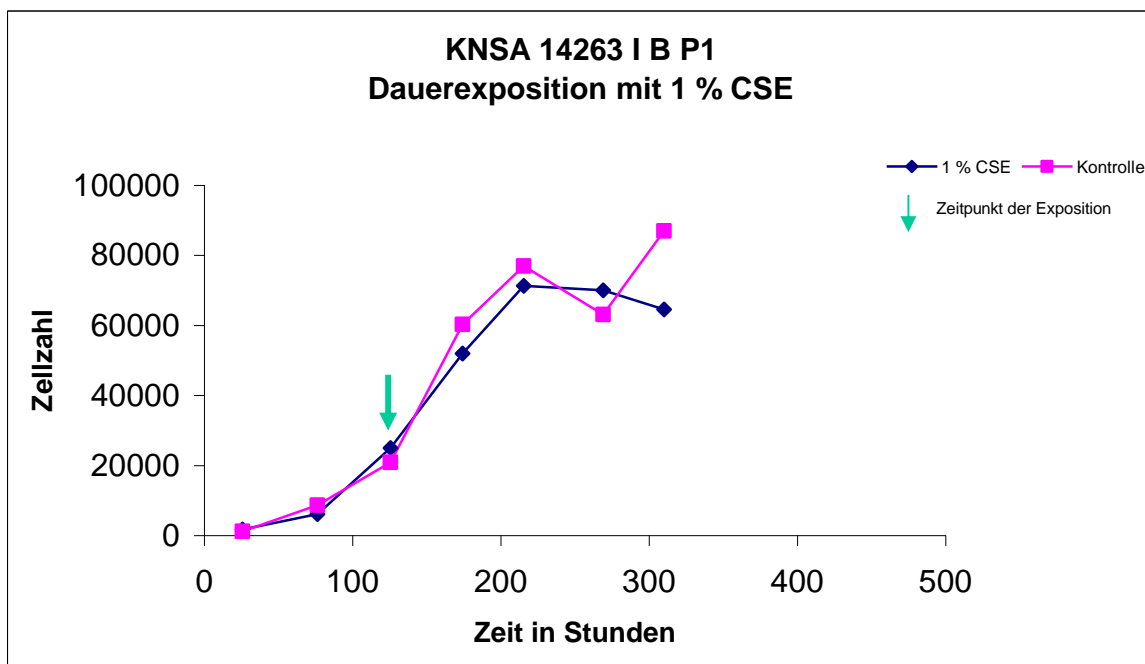


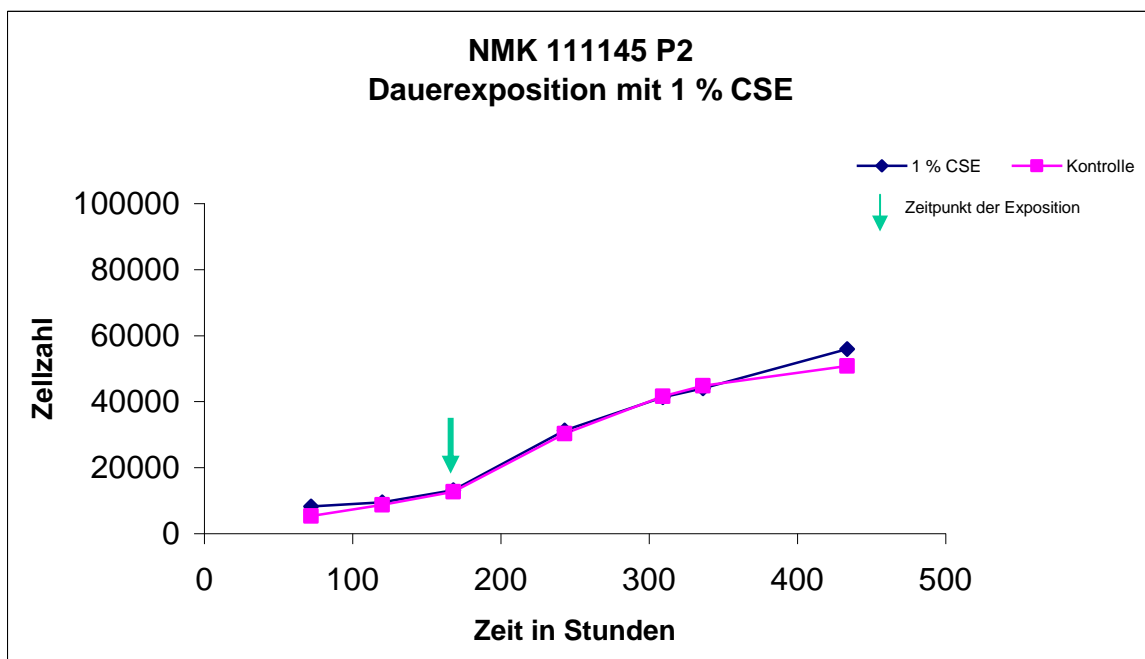
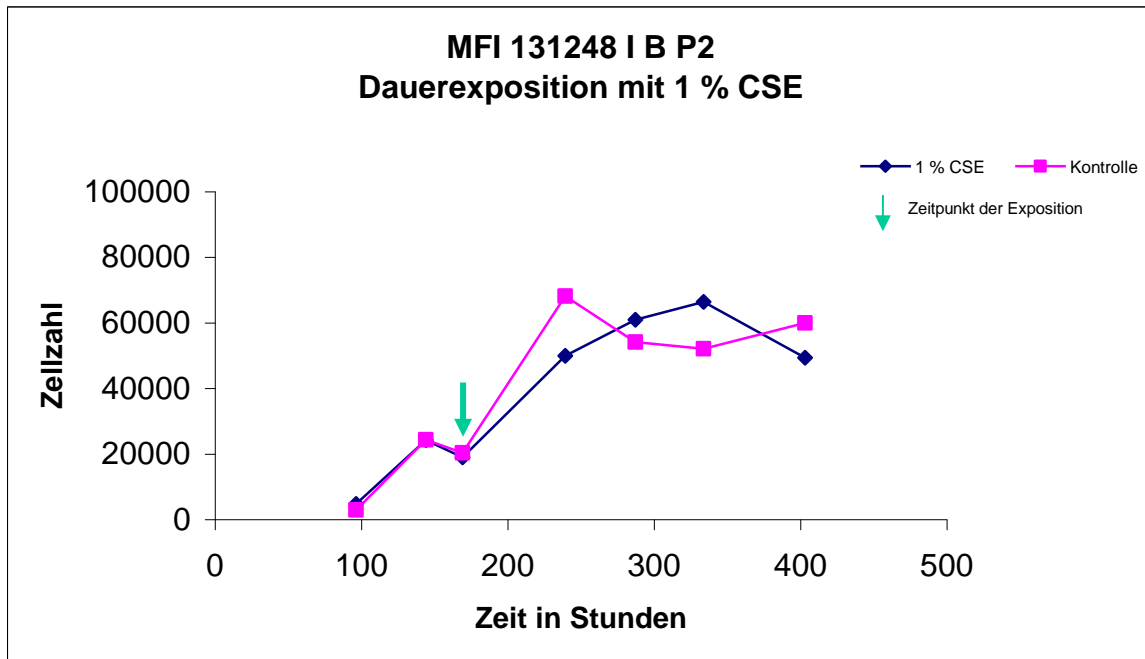
8.4.4. 10% CSE



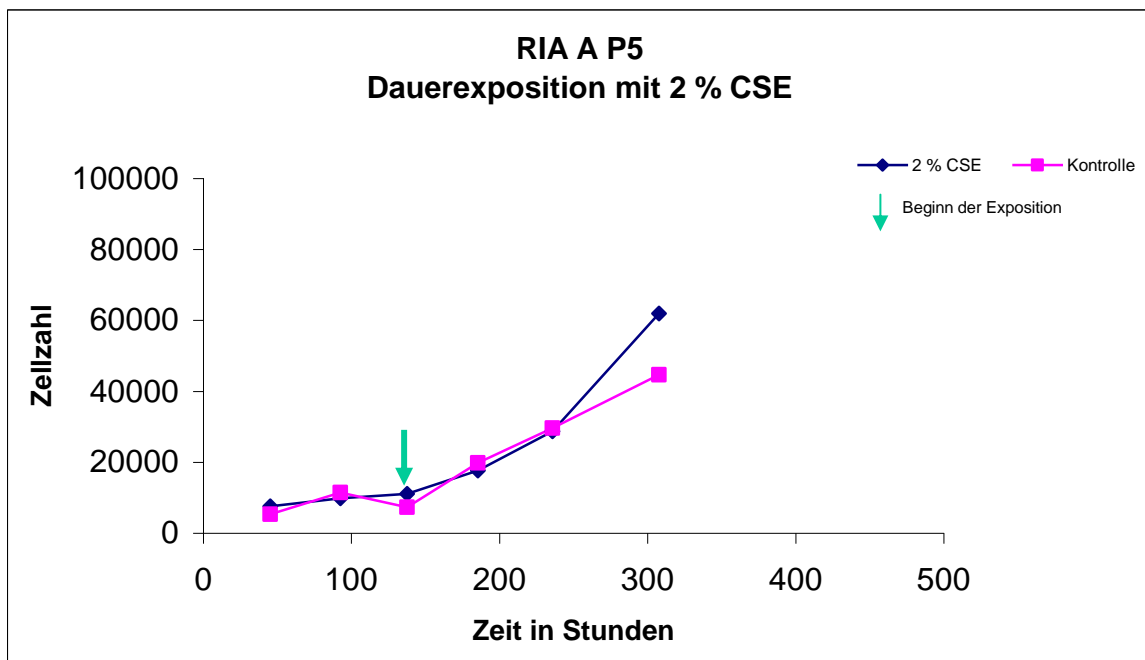
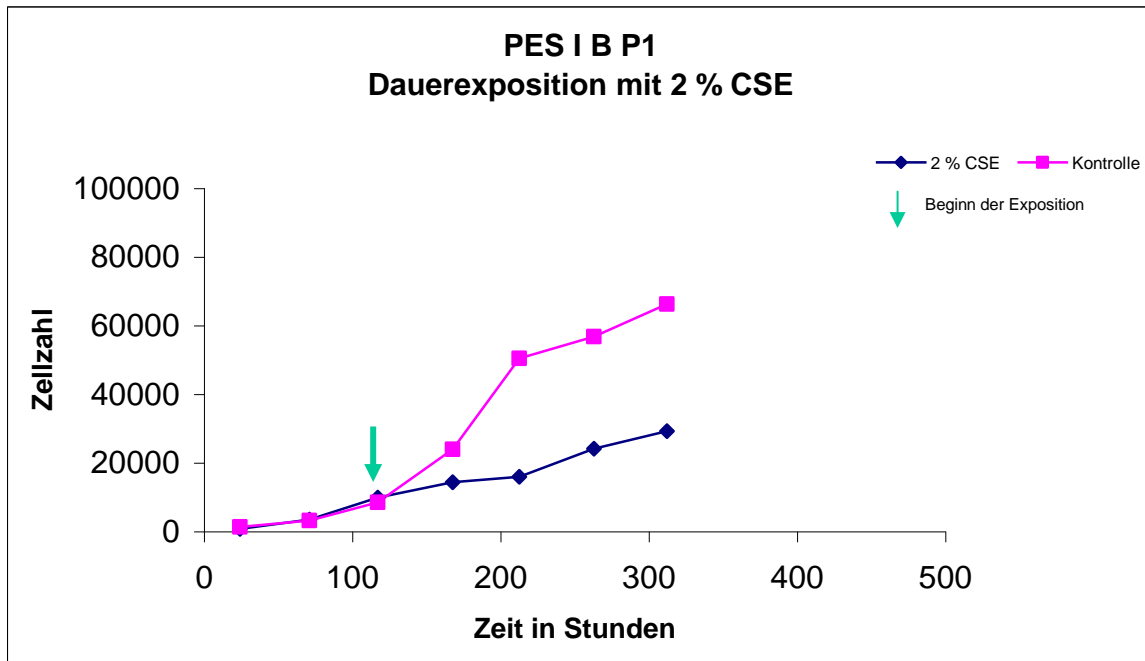
8.5. Diagramme einer dauerhaften Exposition mit CSE in D-MEM

8.5.1. 1% CSE

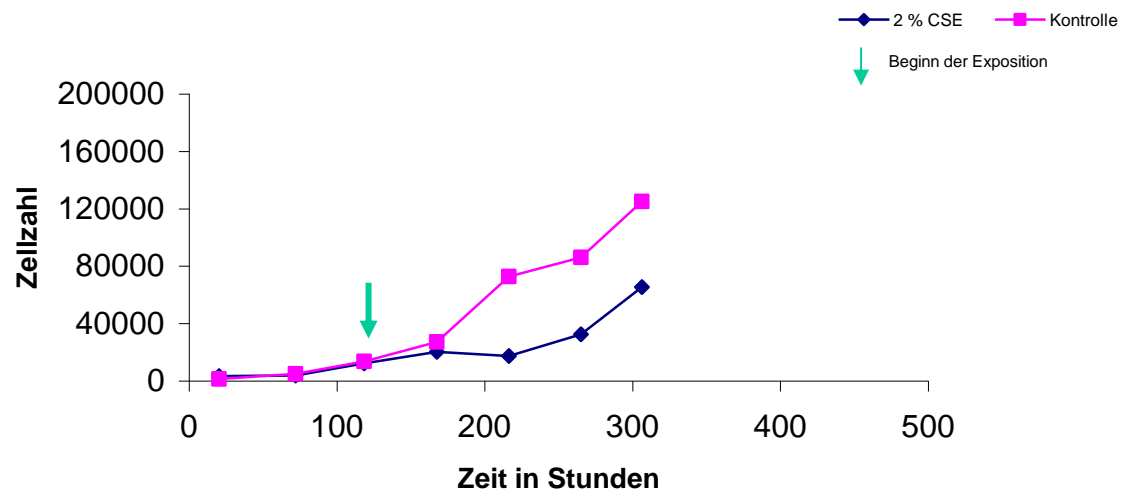




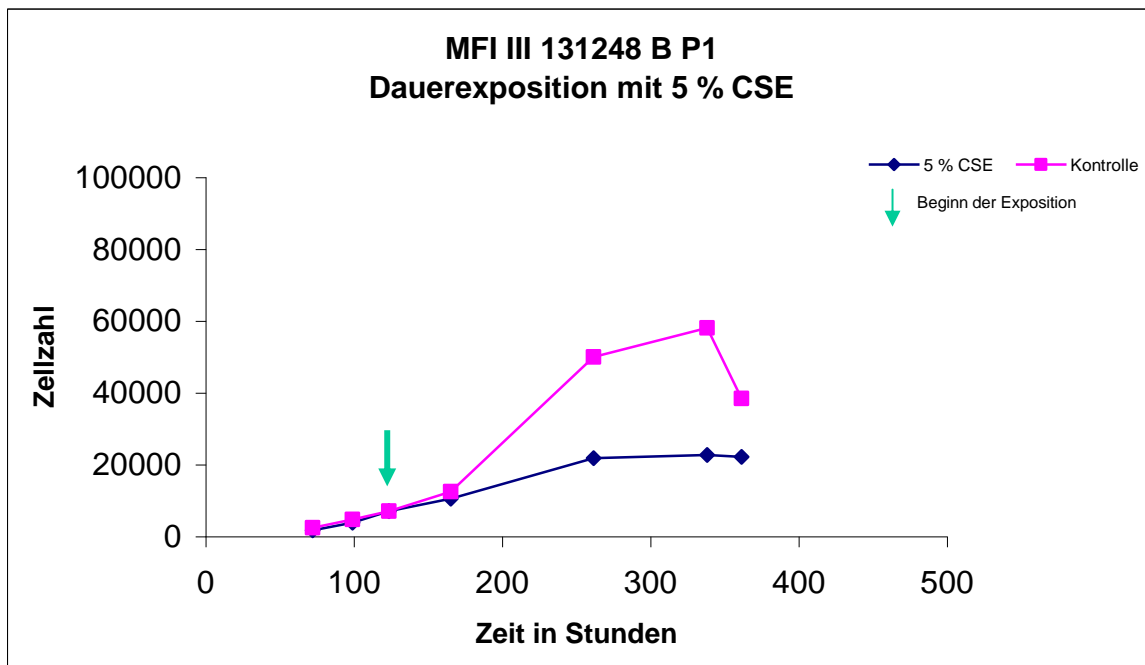
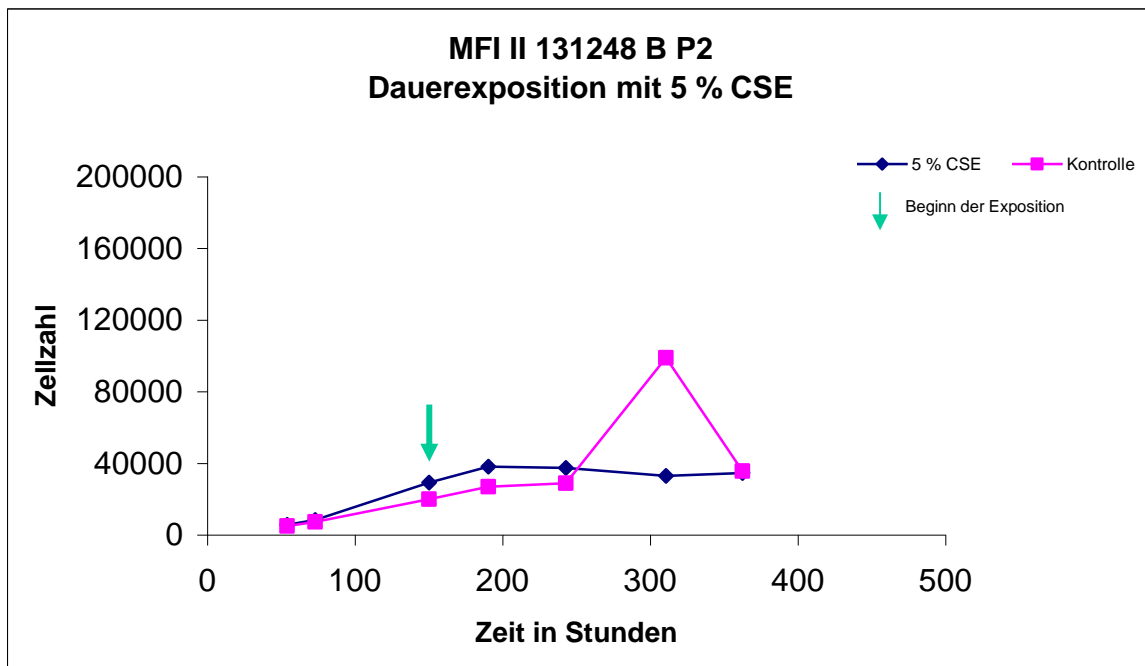
8.5.2. 2% CSE

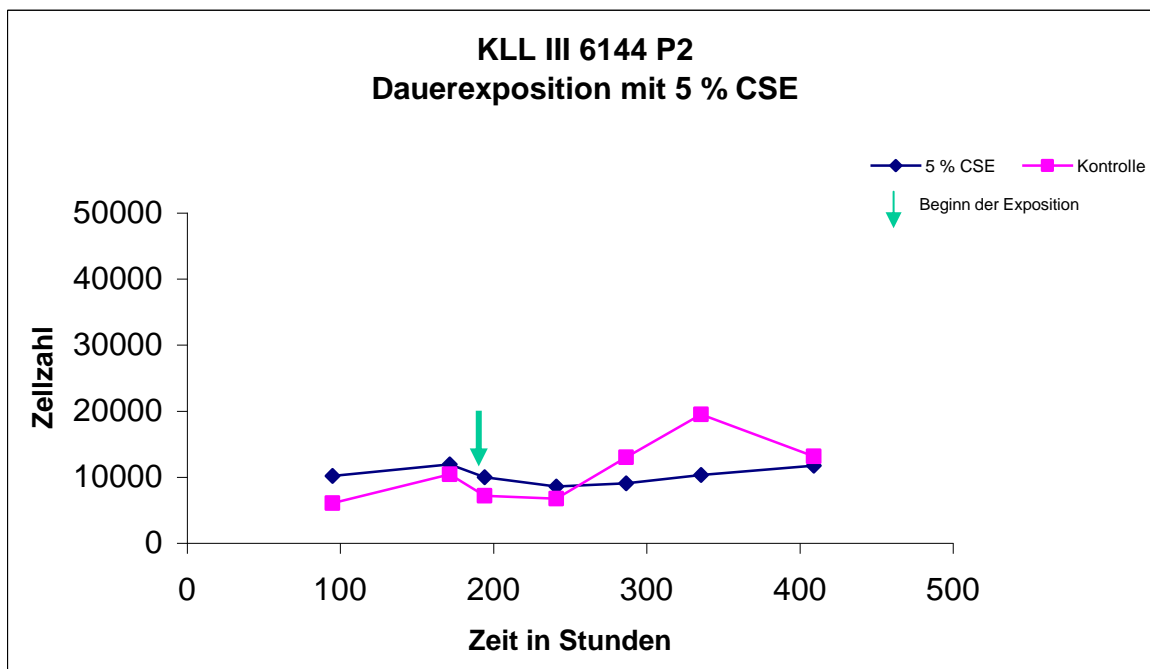
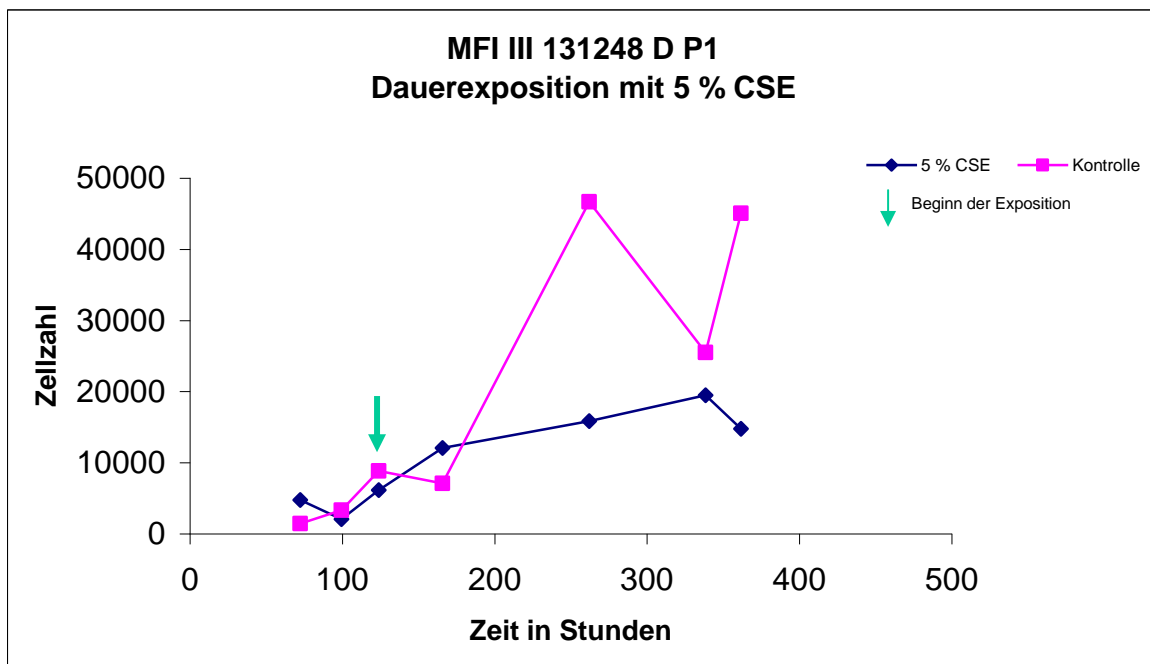


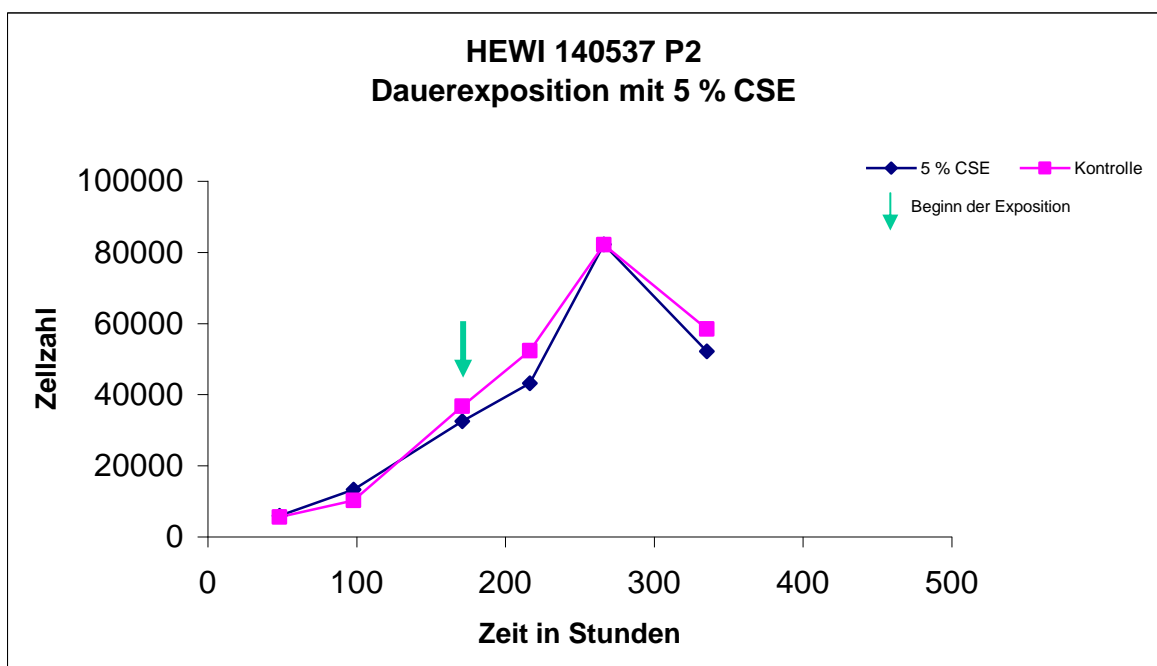
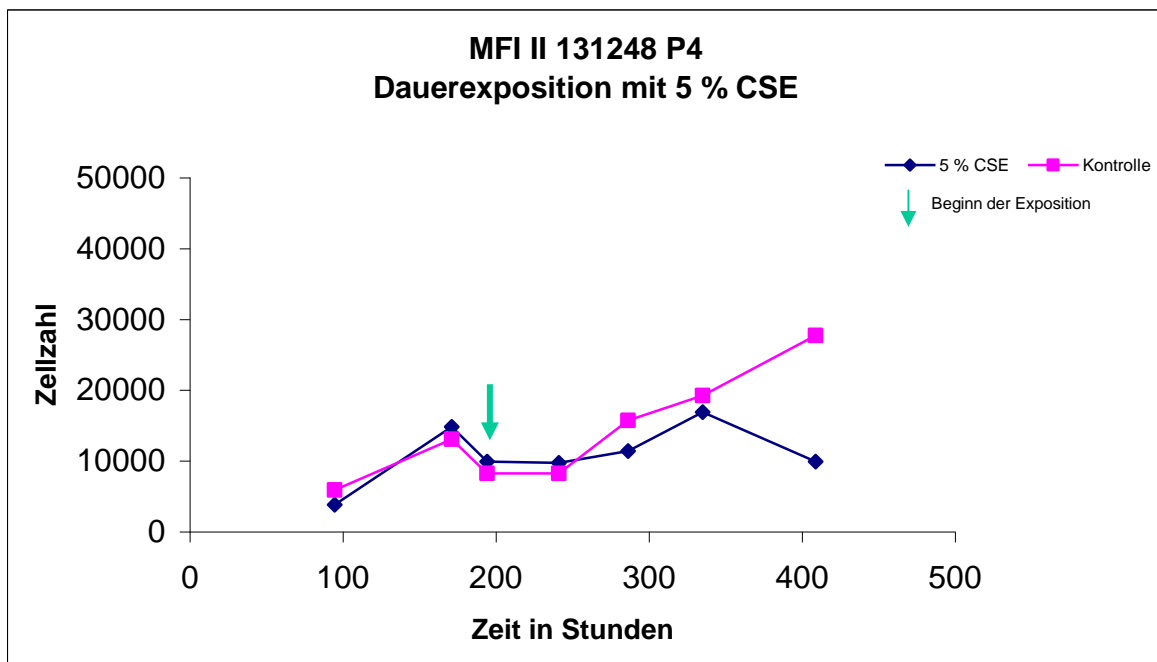
GB 31138 B P1
Dauerexposition mit 2 % CSE

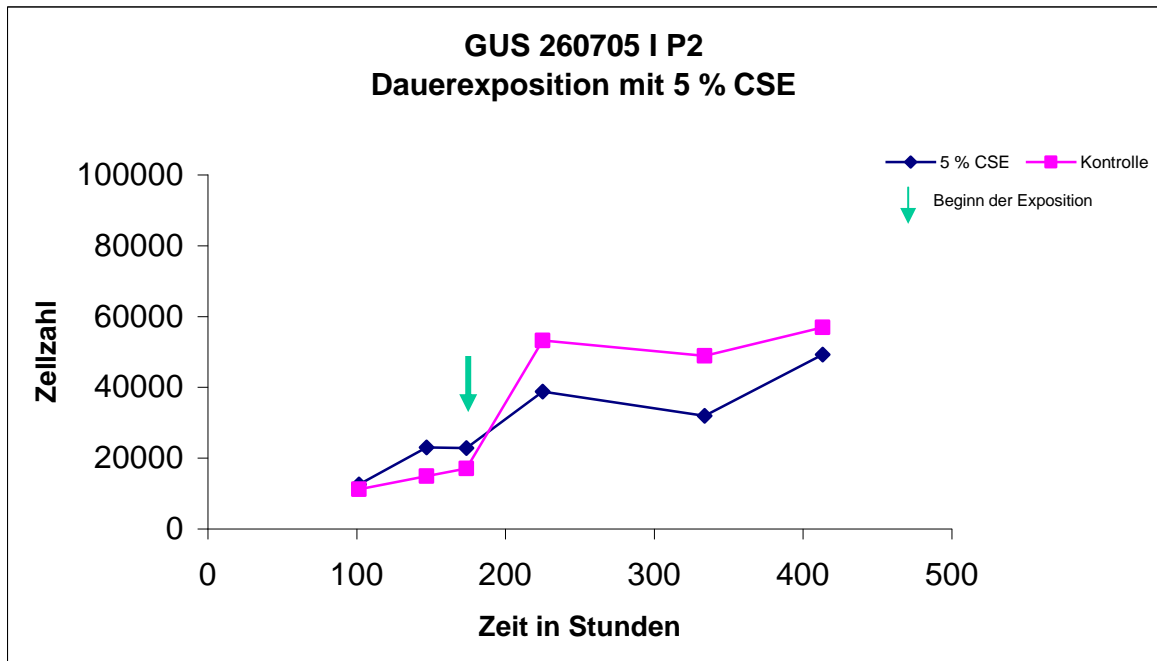


8.5.3. 5% CSE

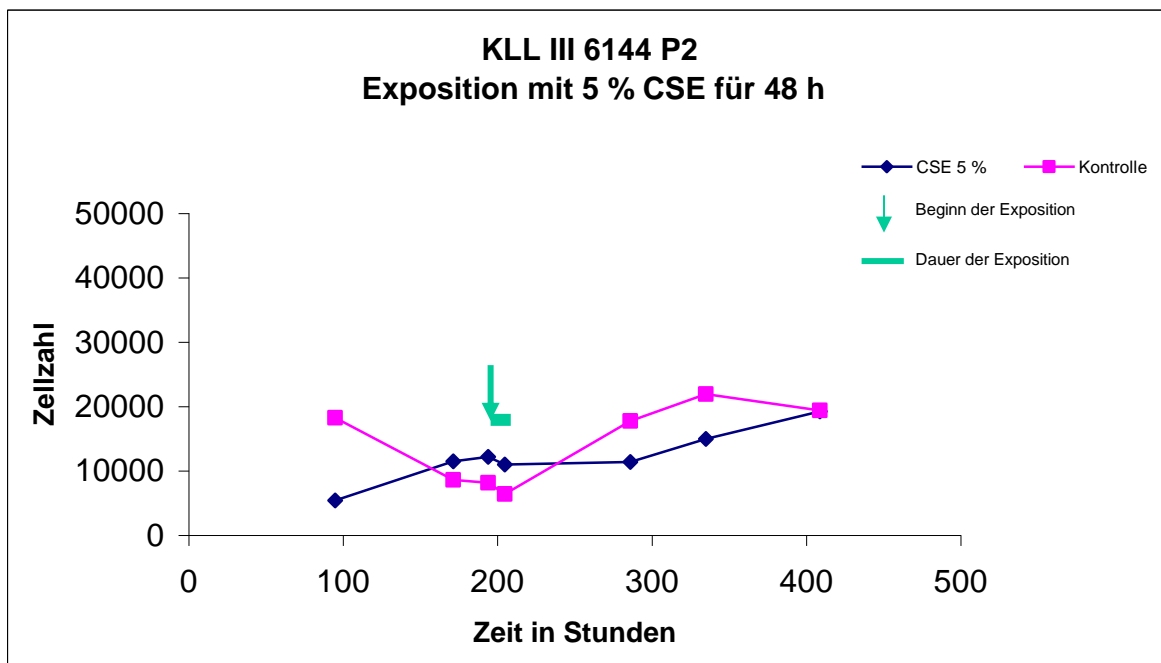
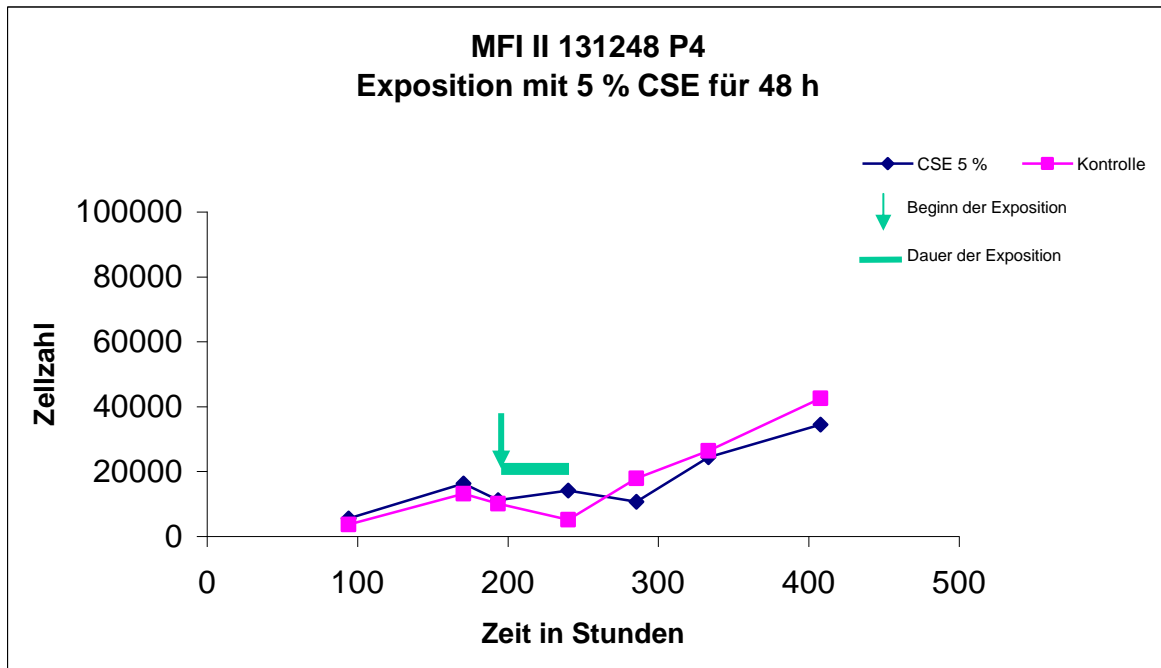


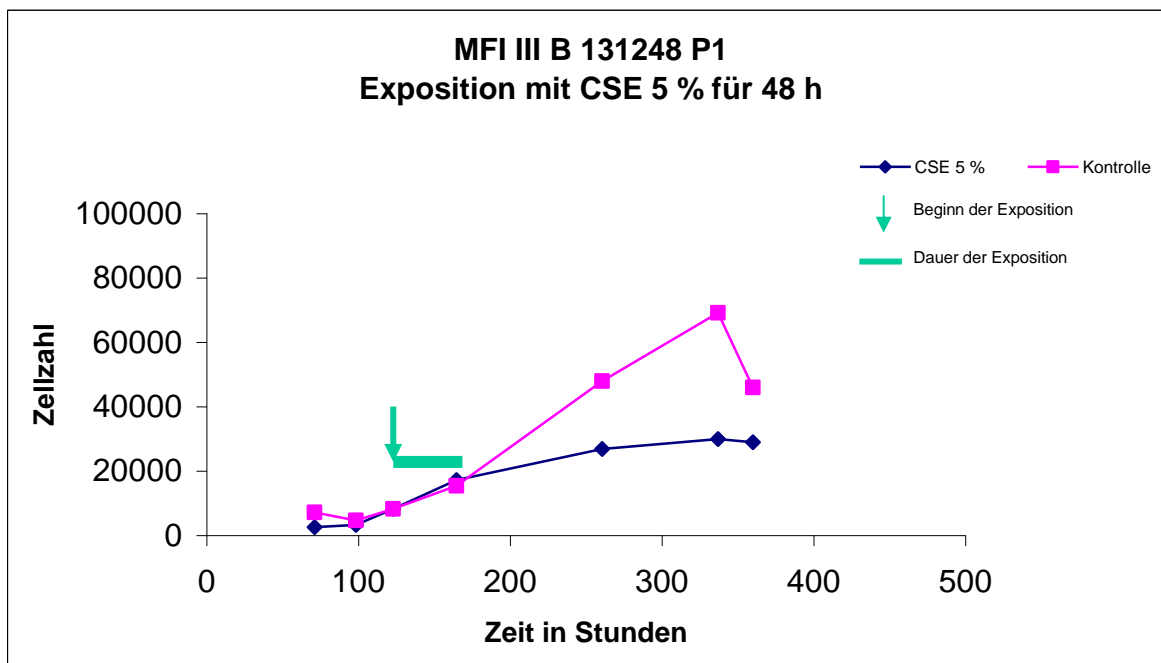
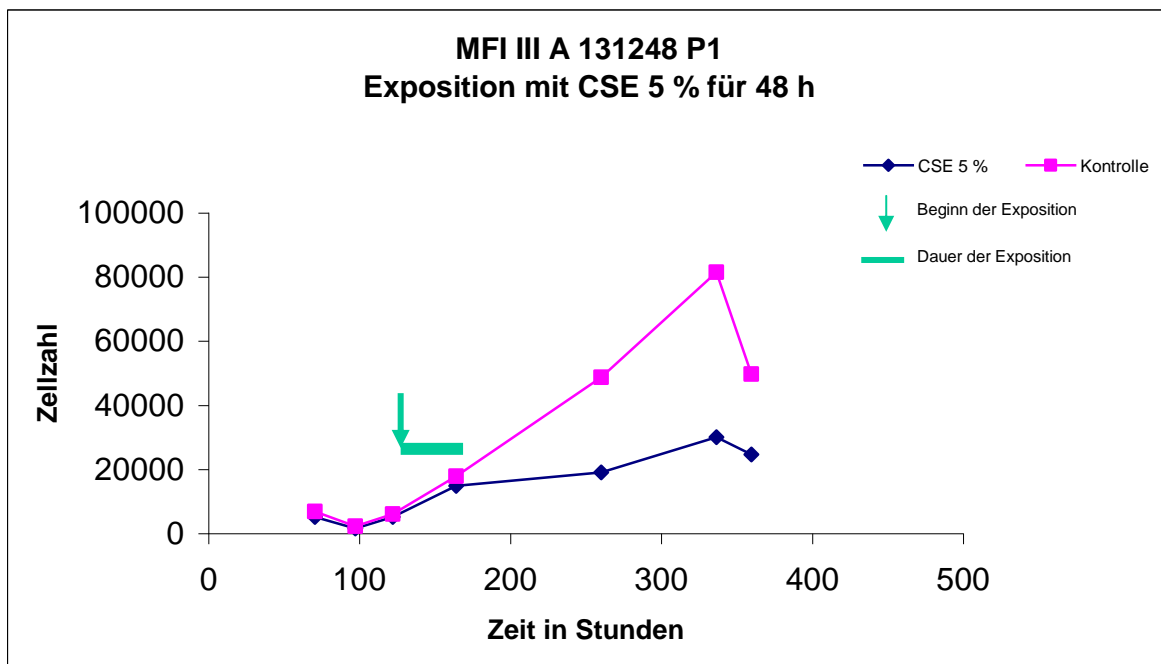


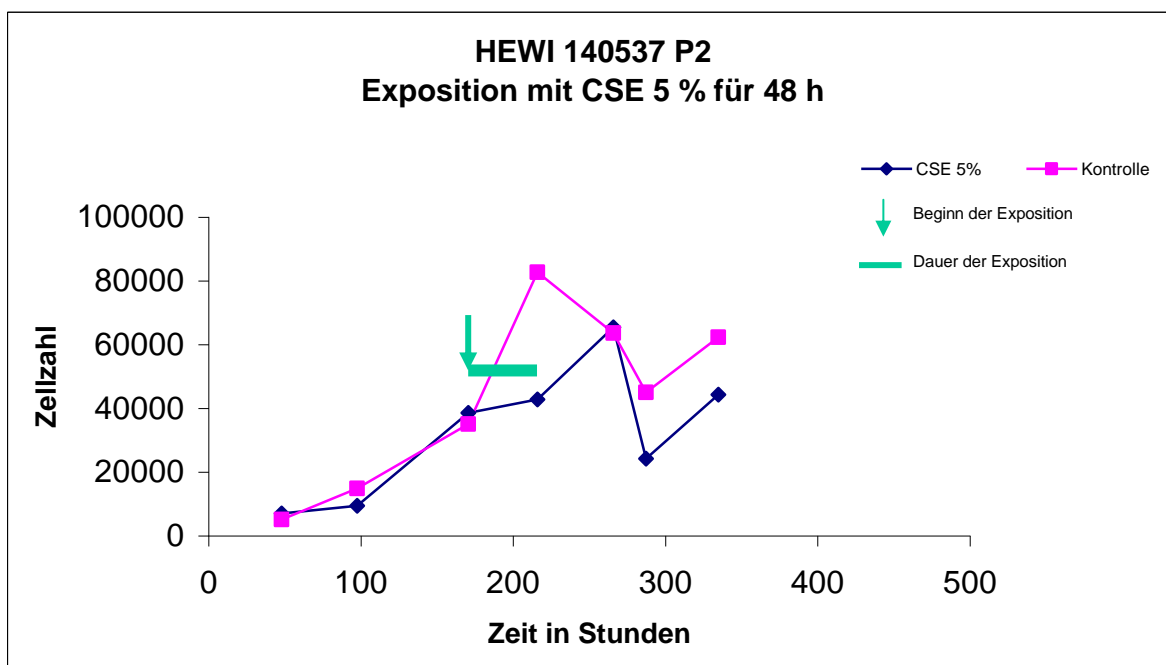
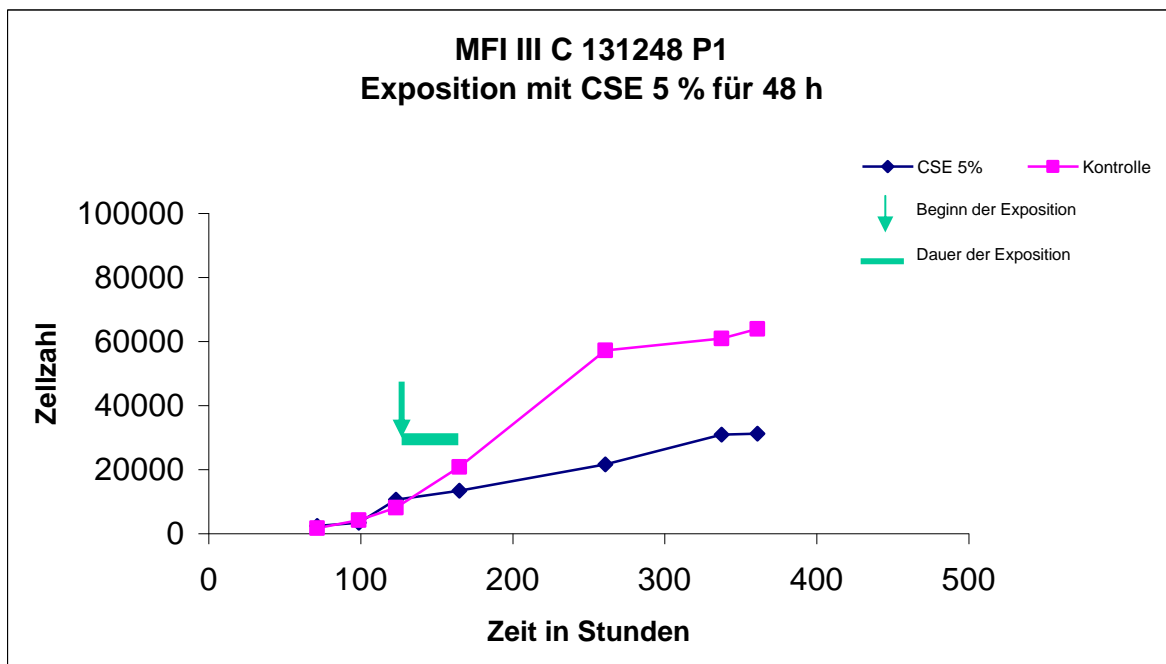


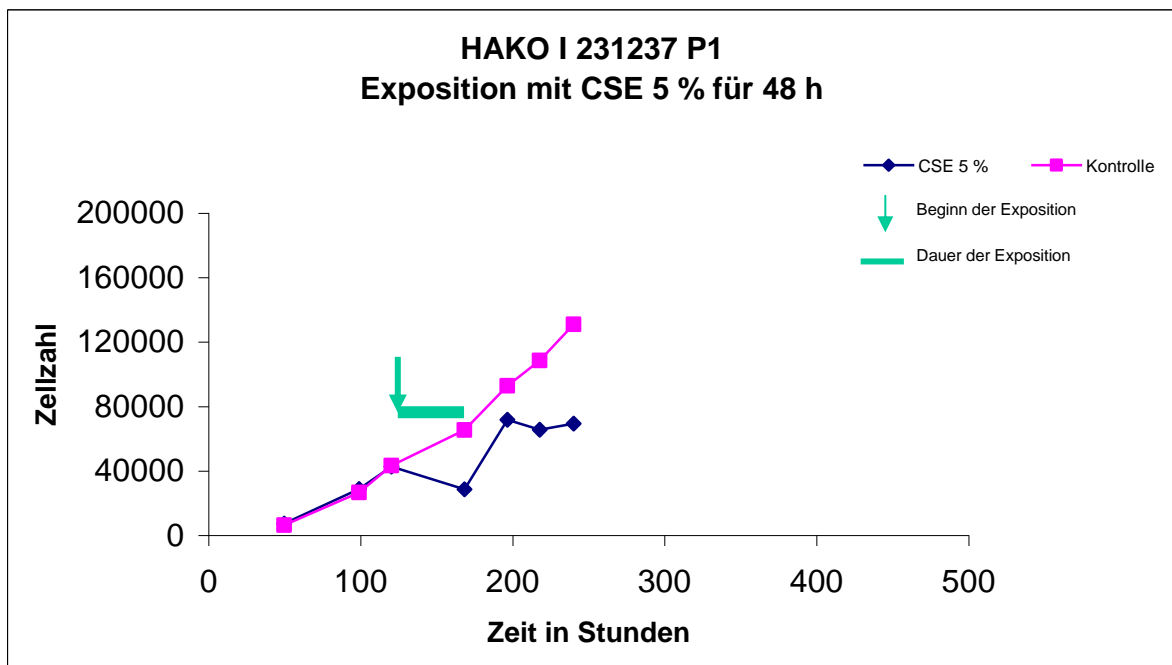
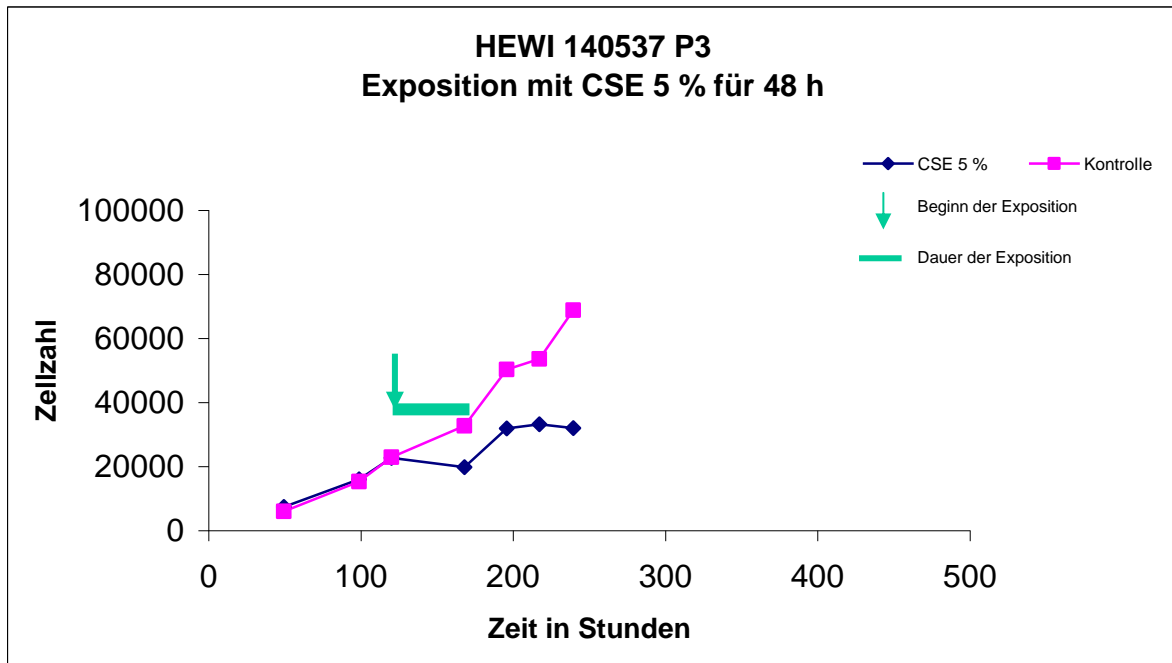


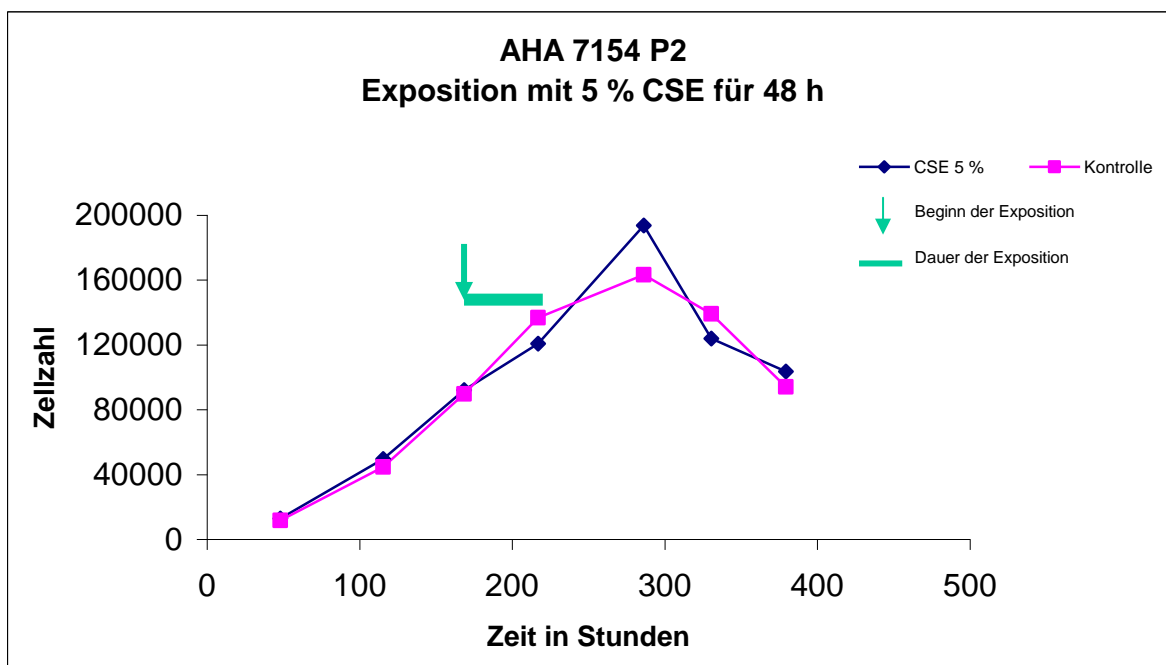
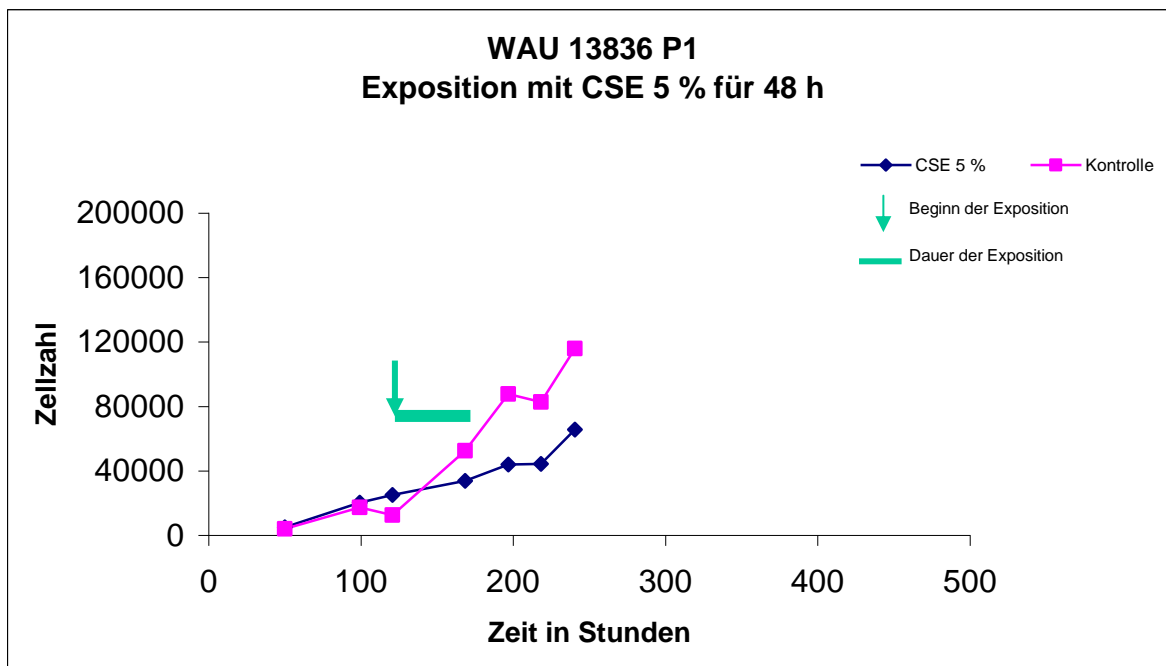
8.6. Diagramme einer temporären Exposition mit 5% CSE in D-MEM

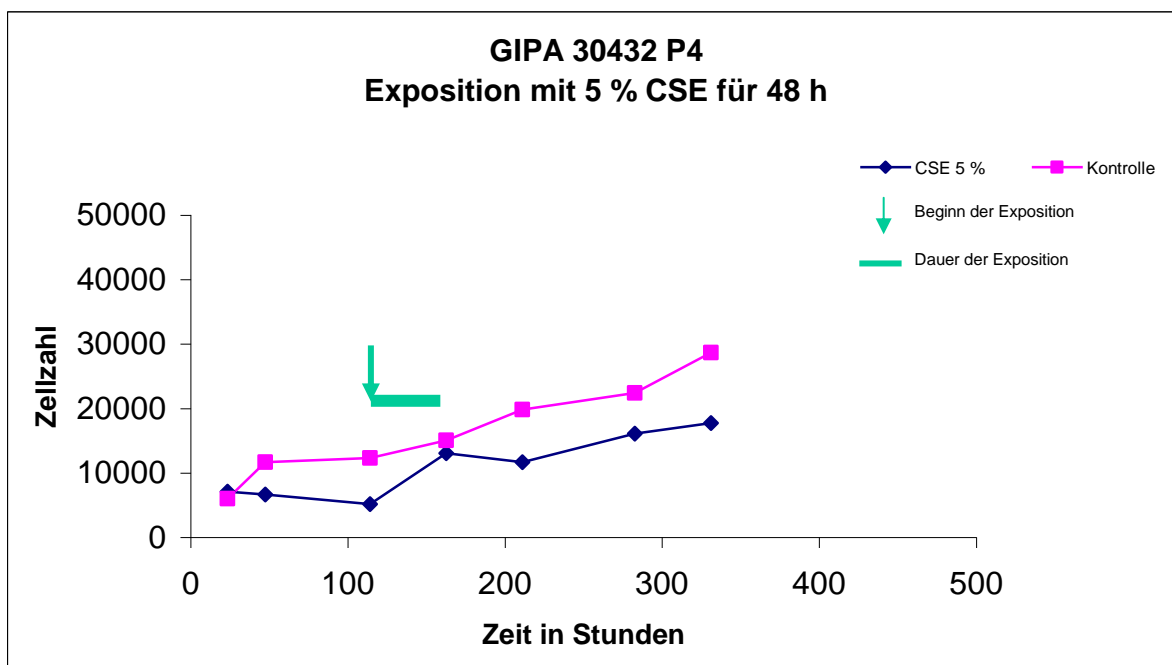
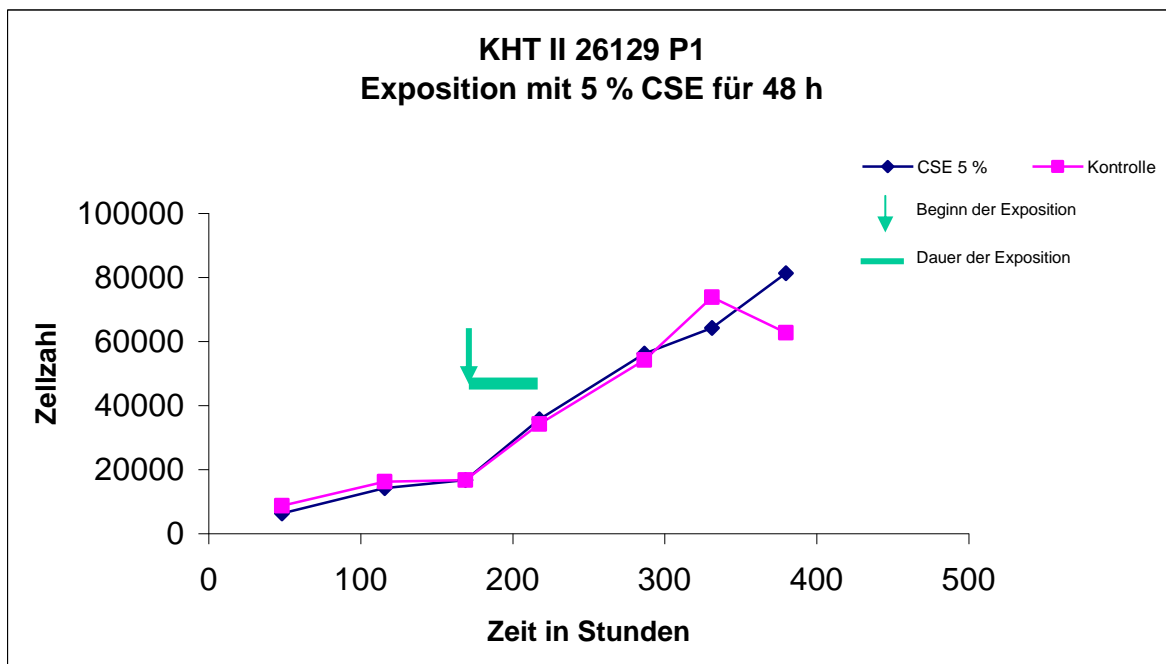


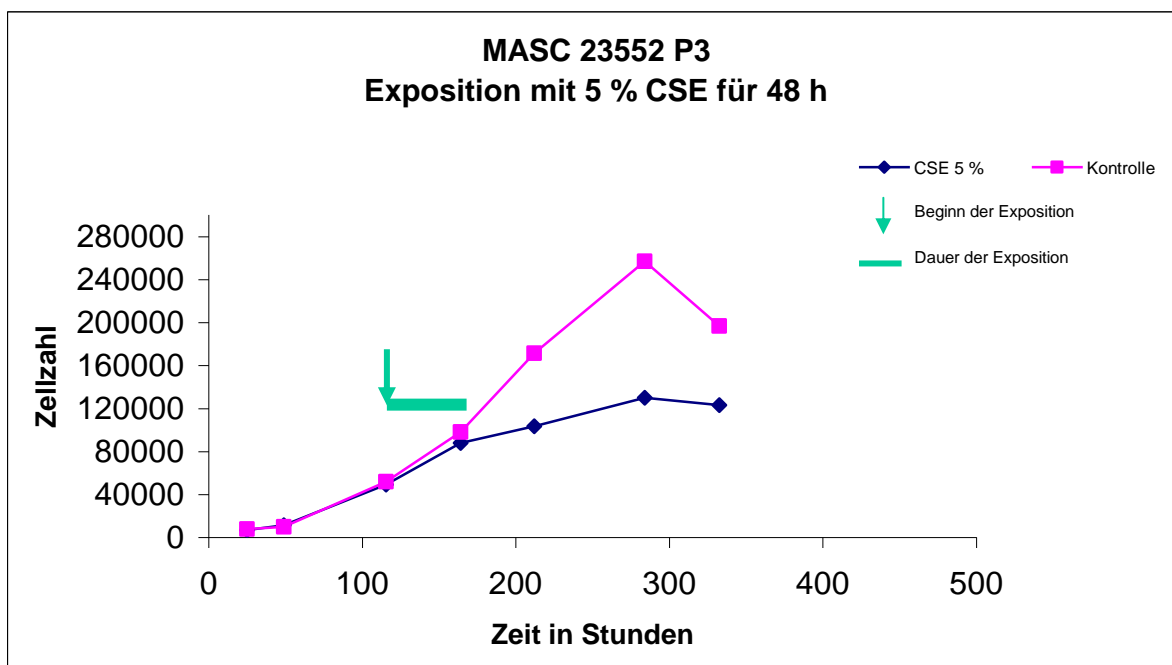
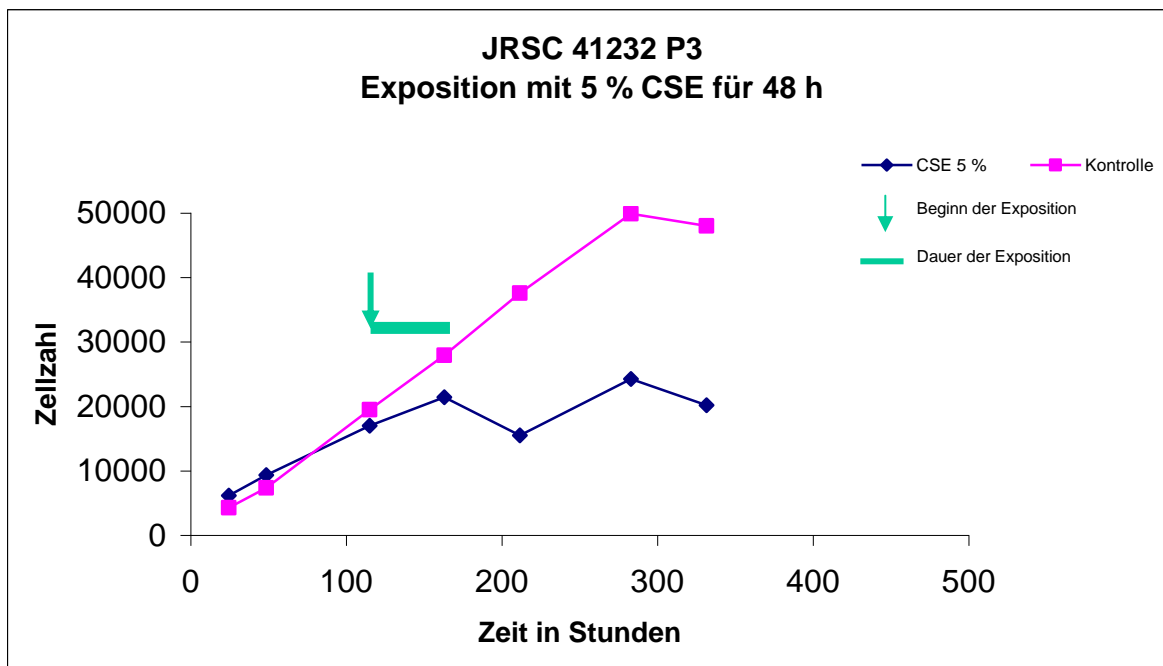


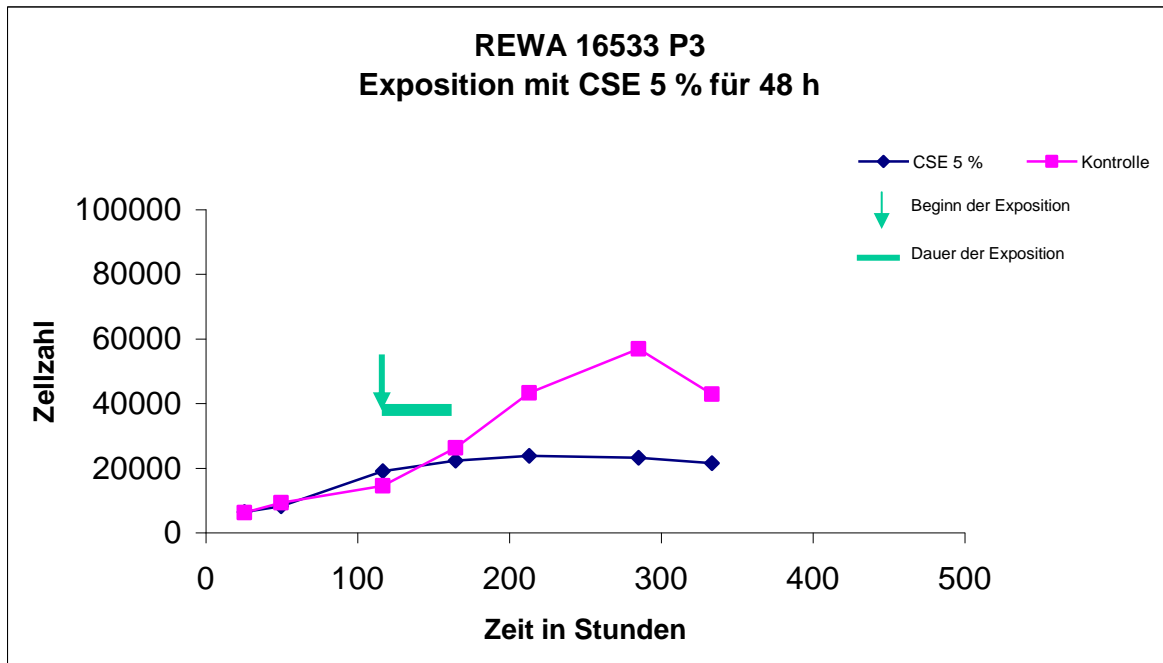




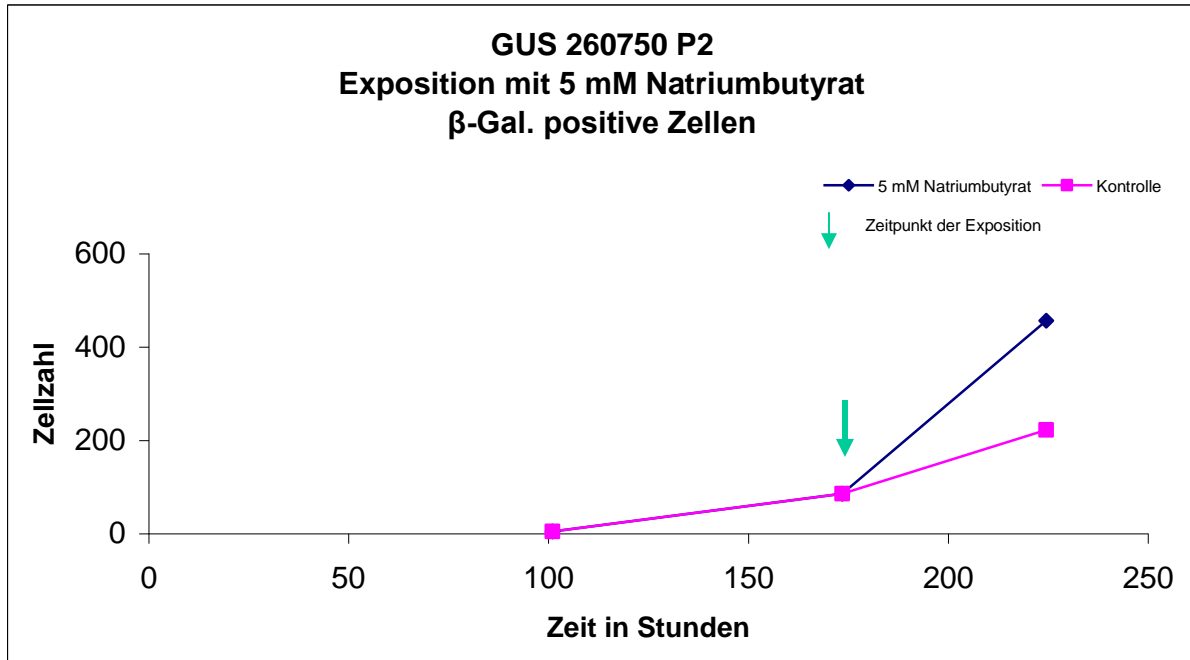
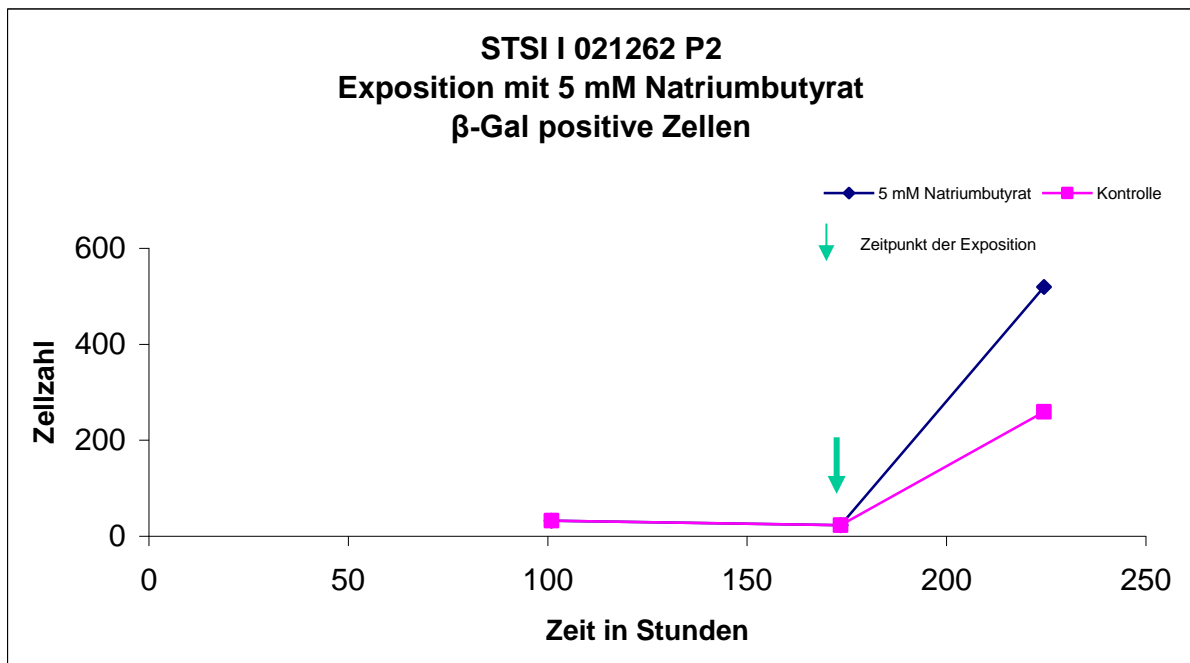


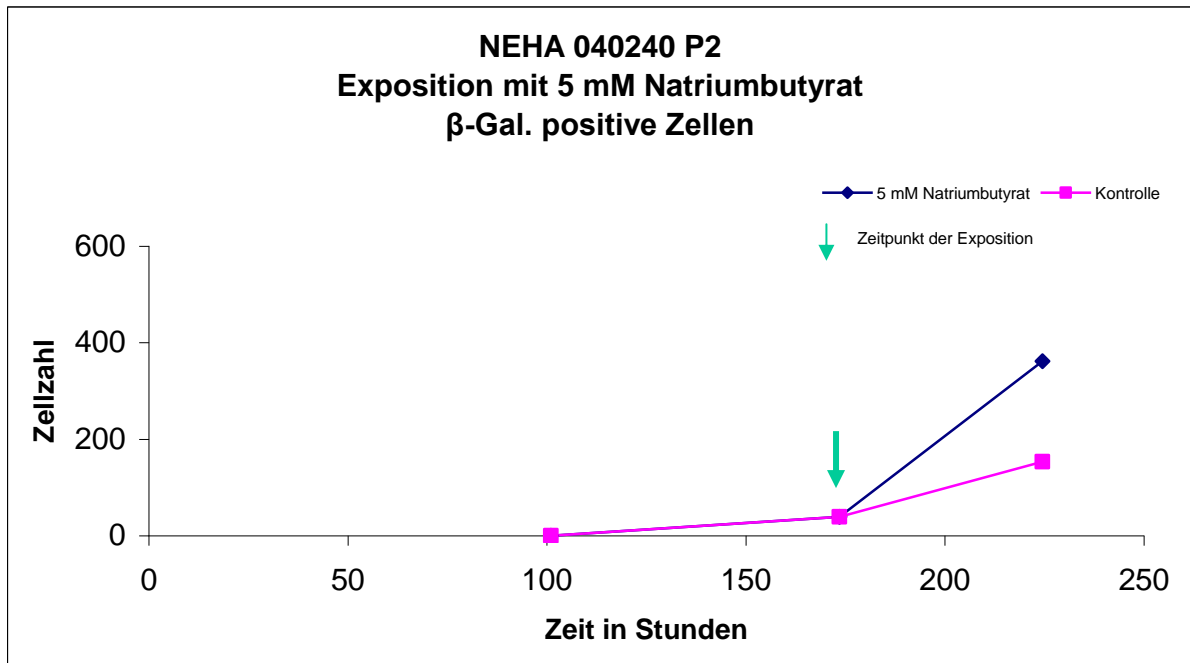




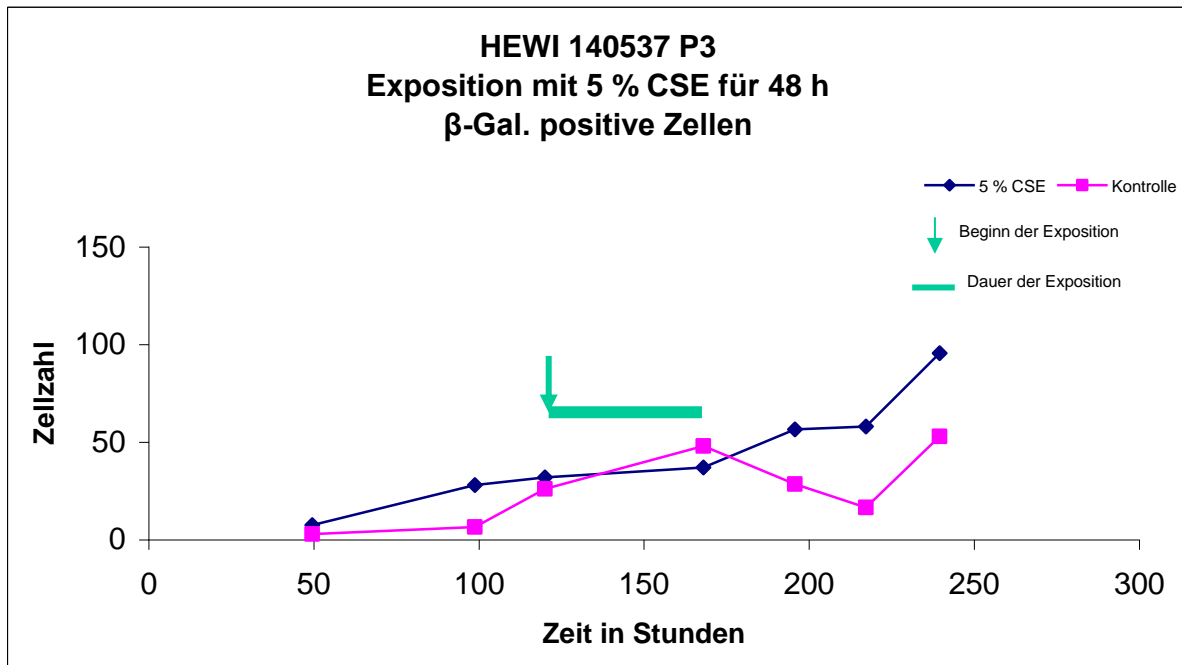
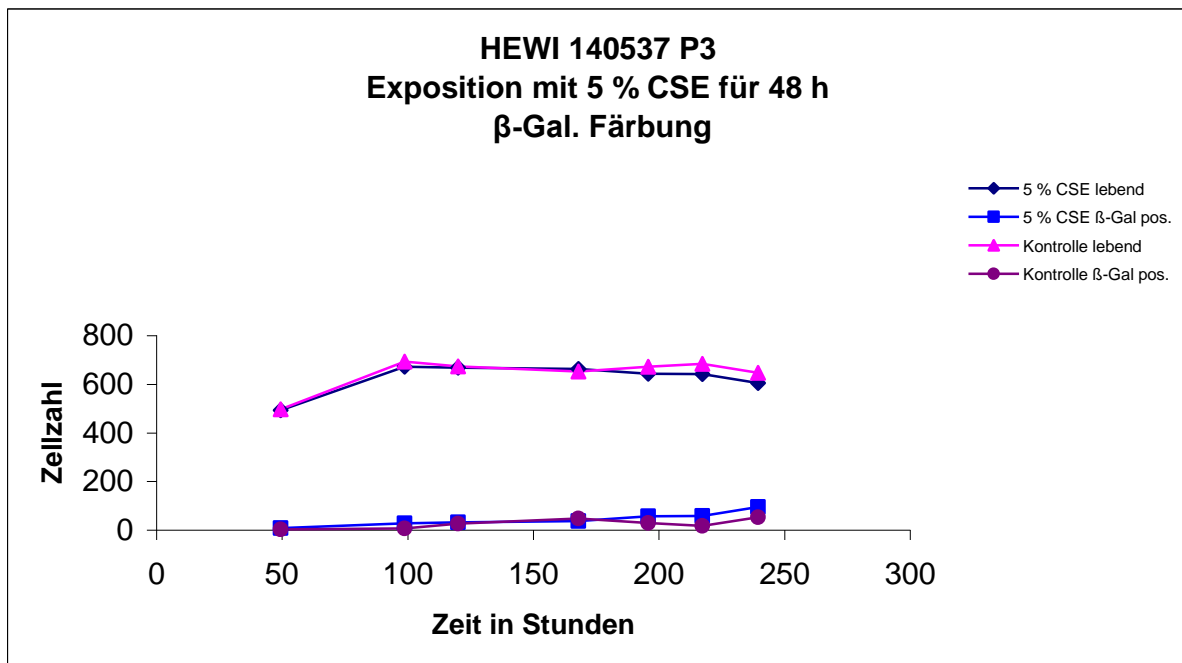


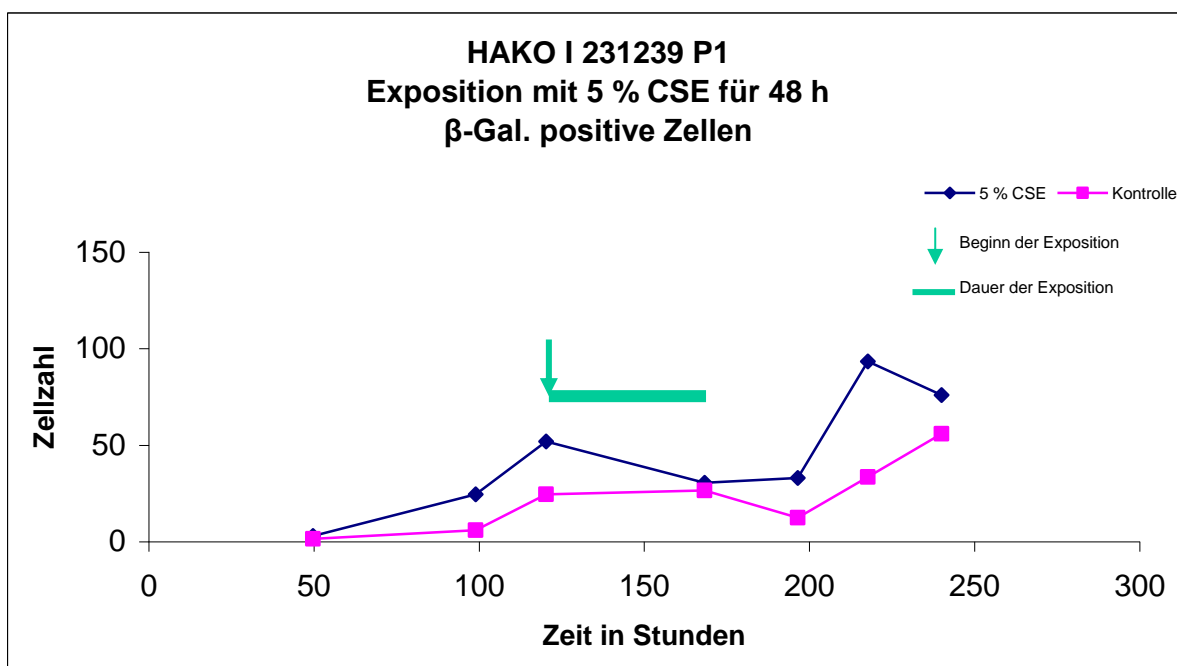
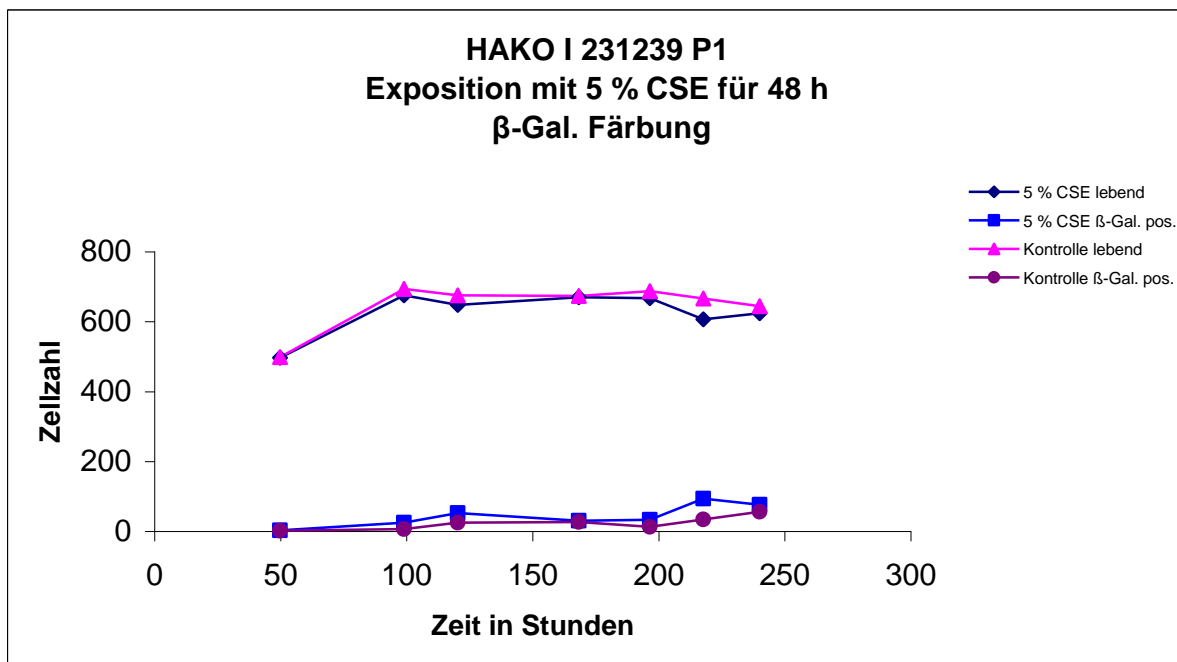
8.7. Diagramme mit Natriumbutyrat

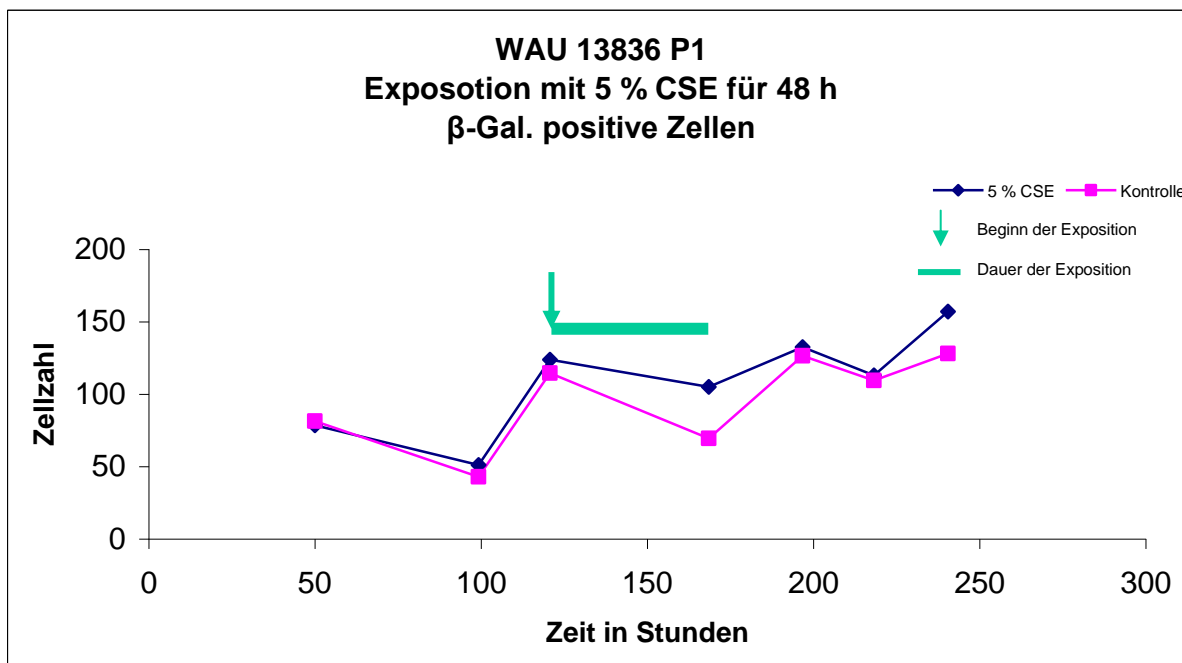
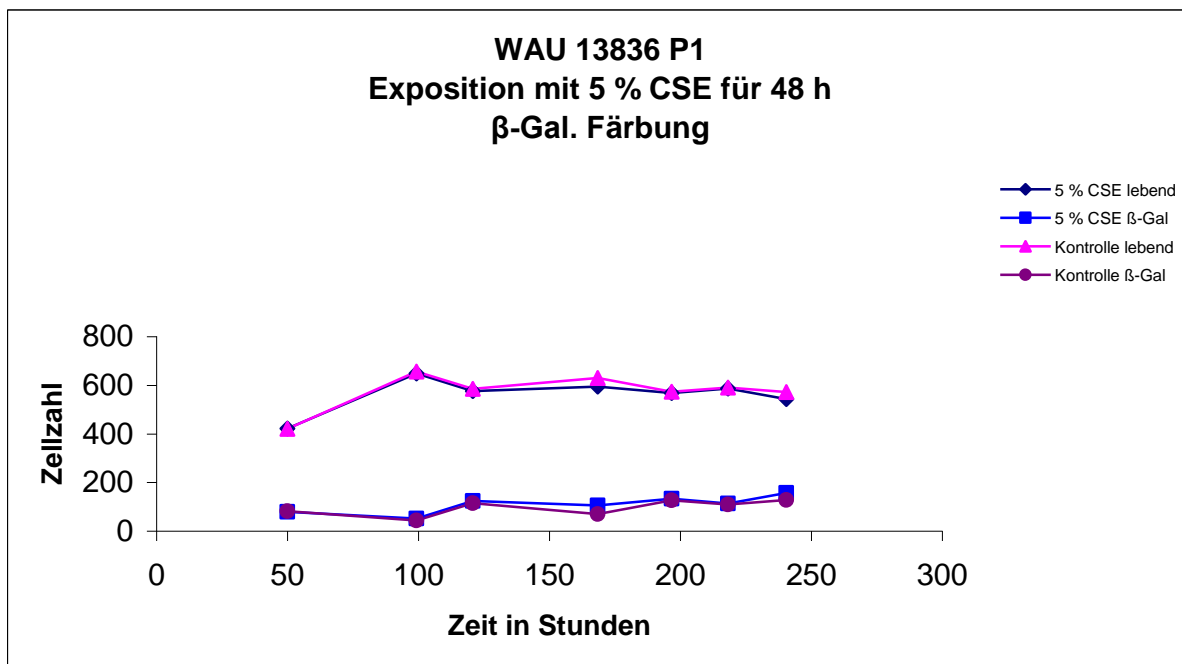


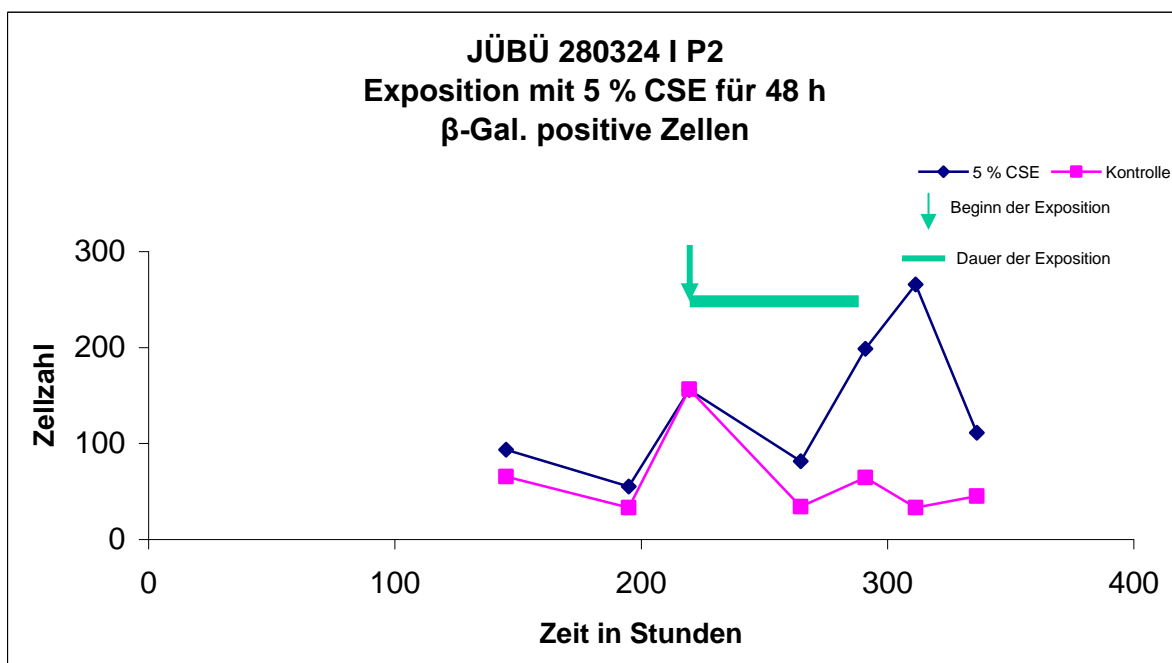
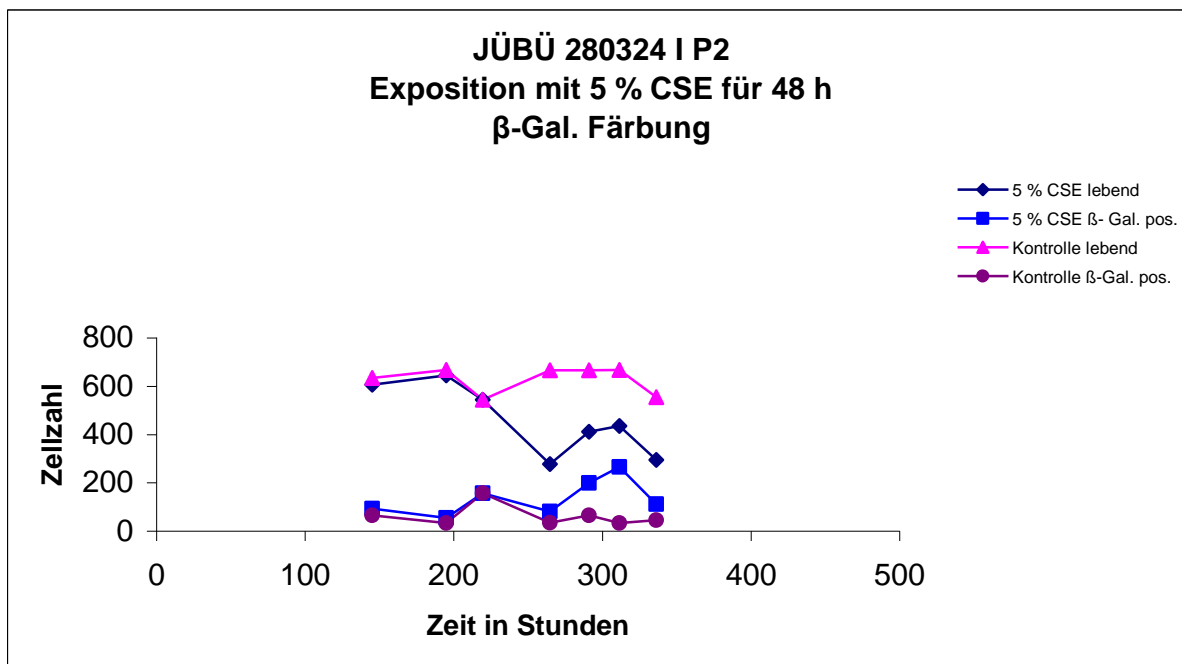


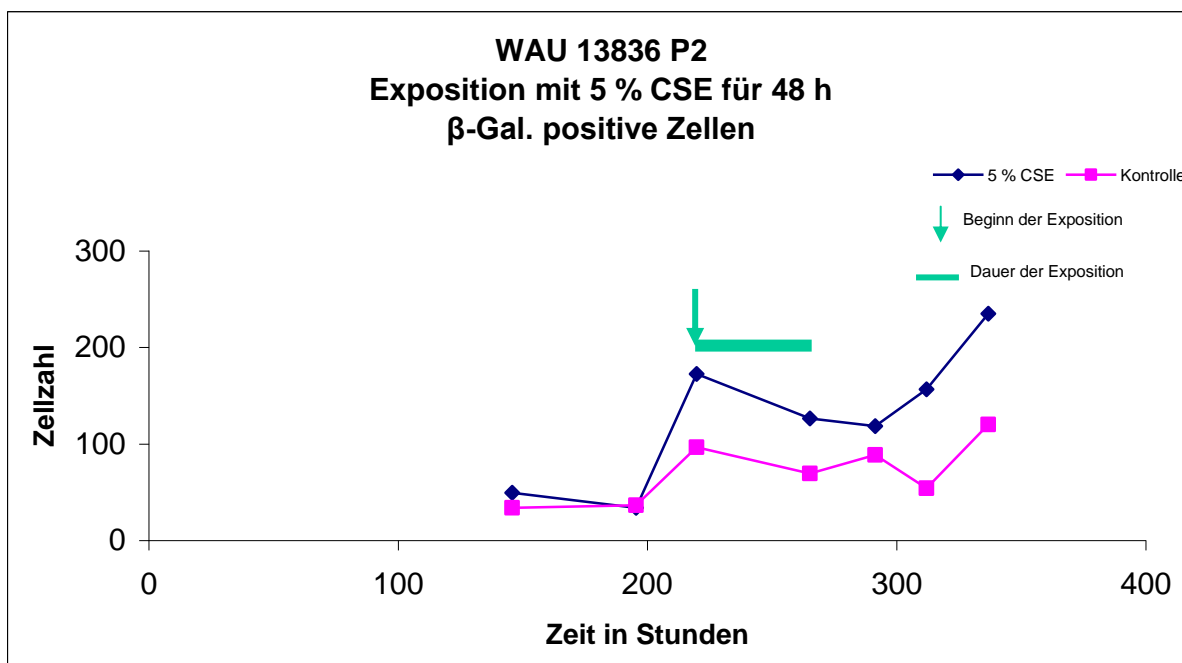
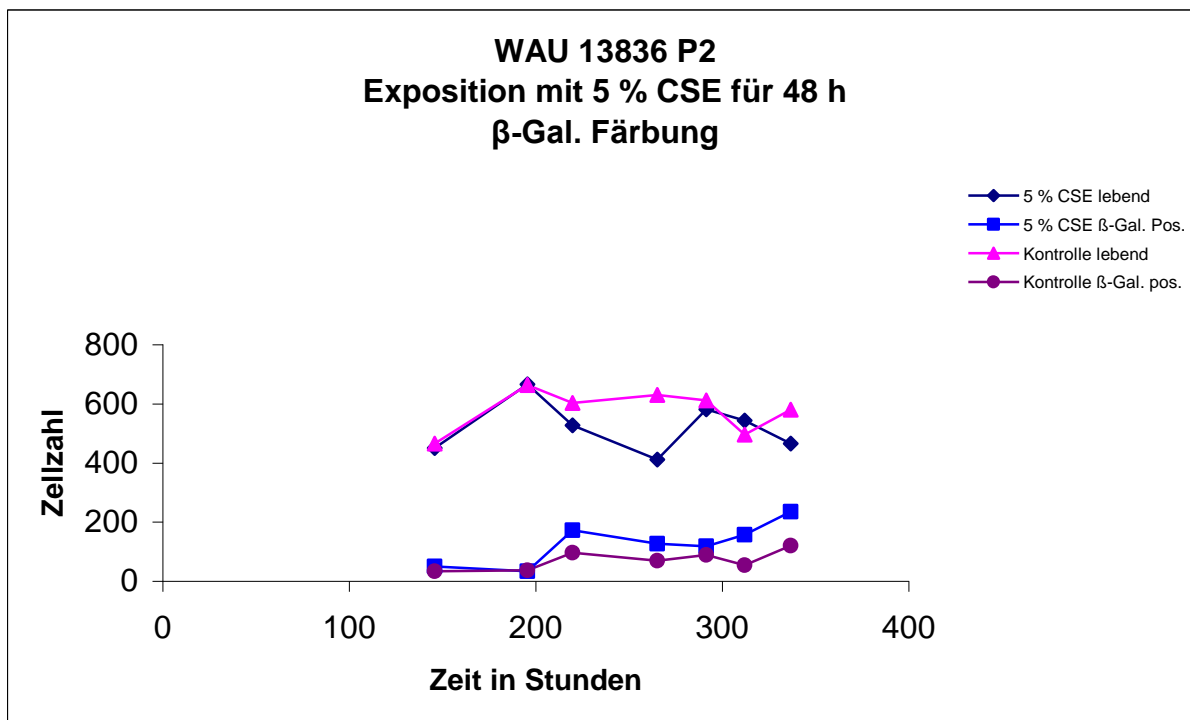
8.8. Diagramme mit β -Galaktosidase Färbung bei 5 % CSE

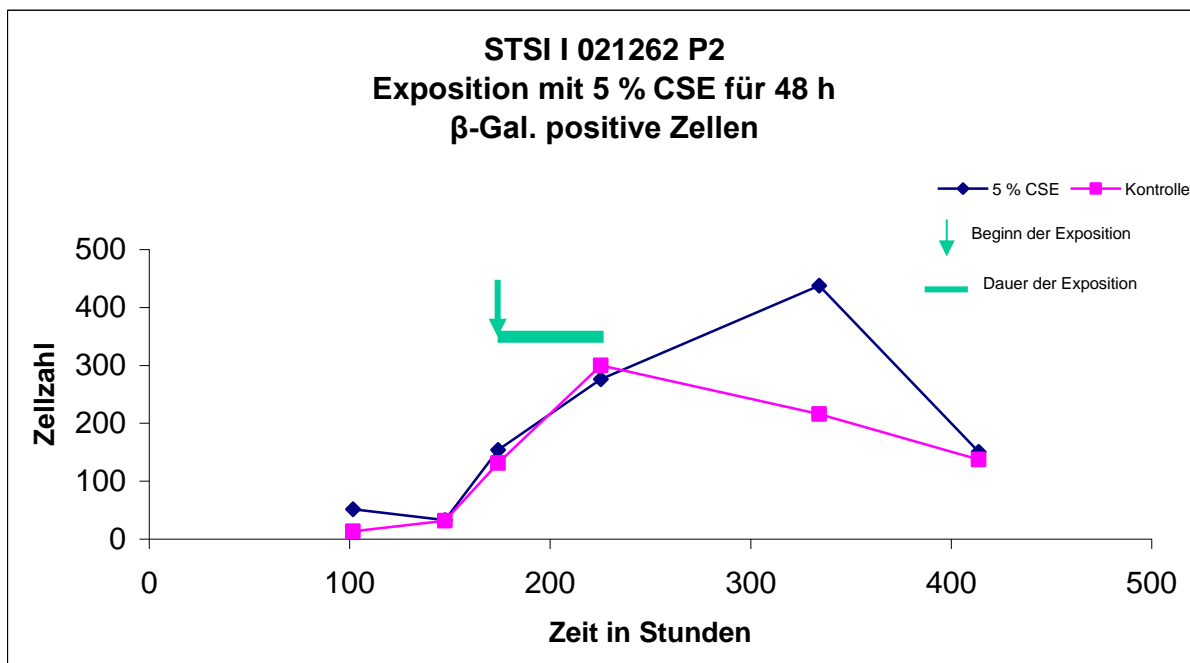
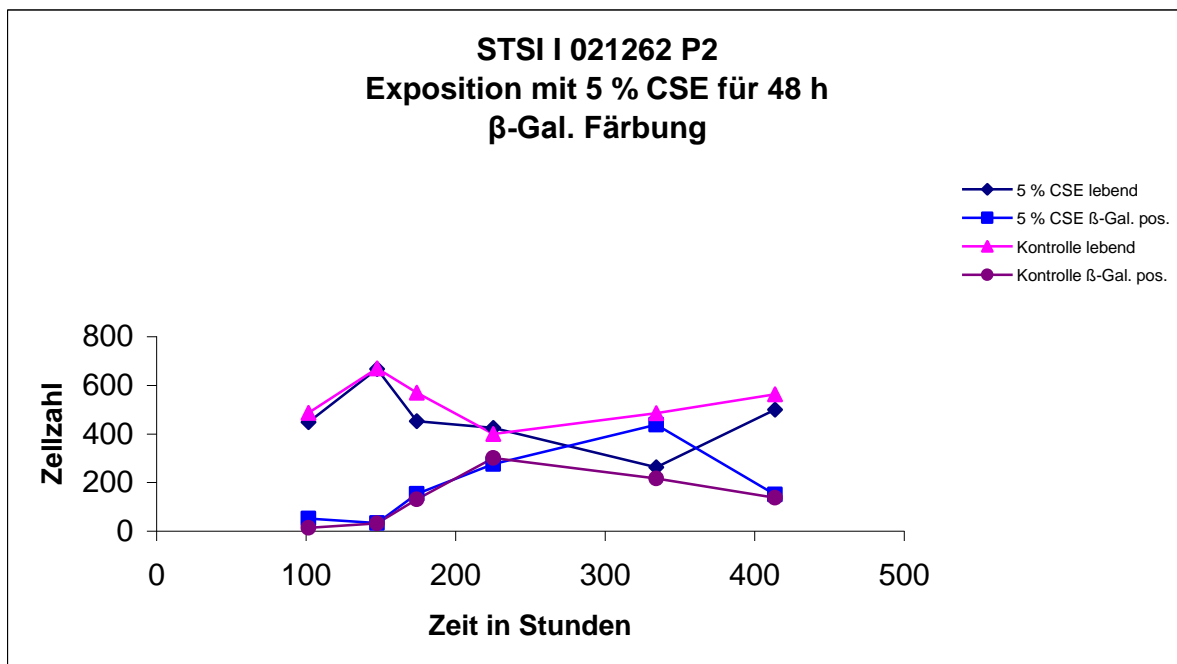


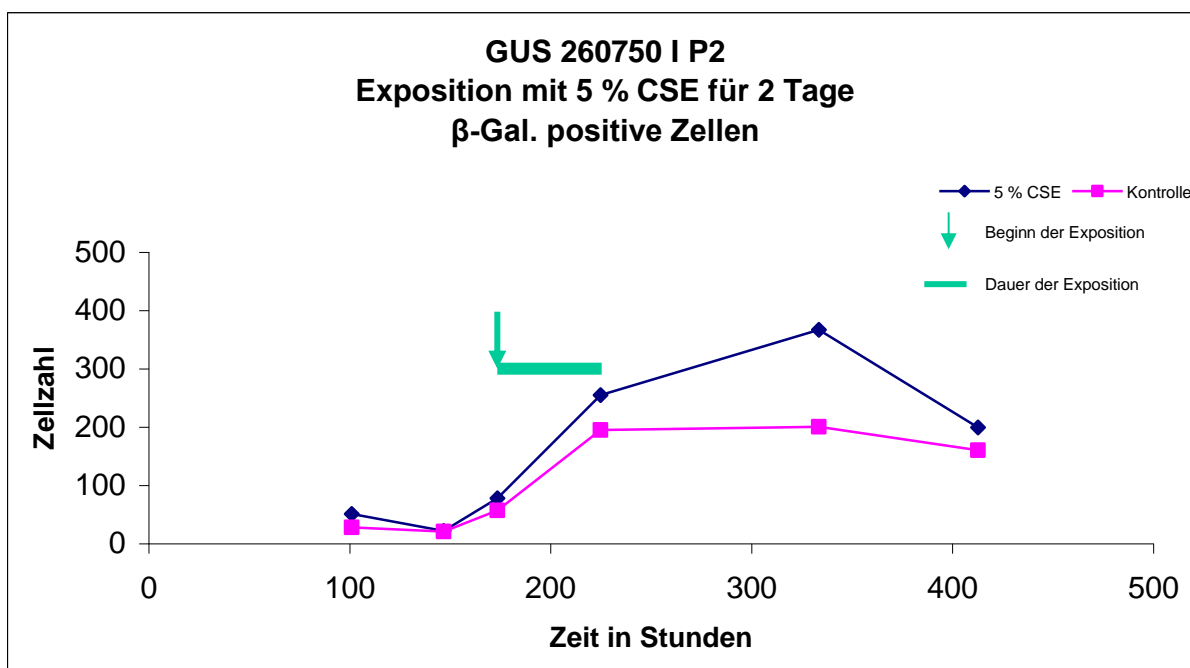
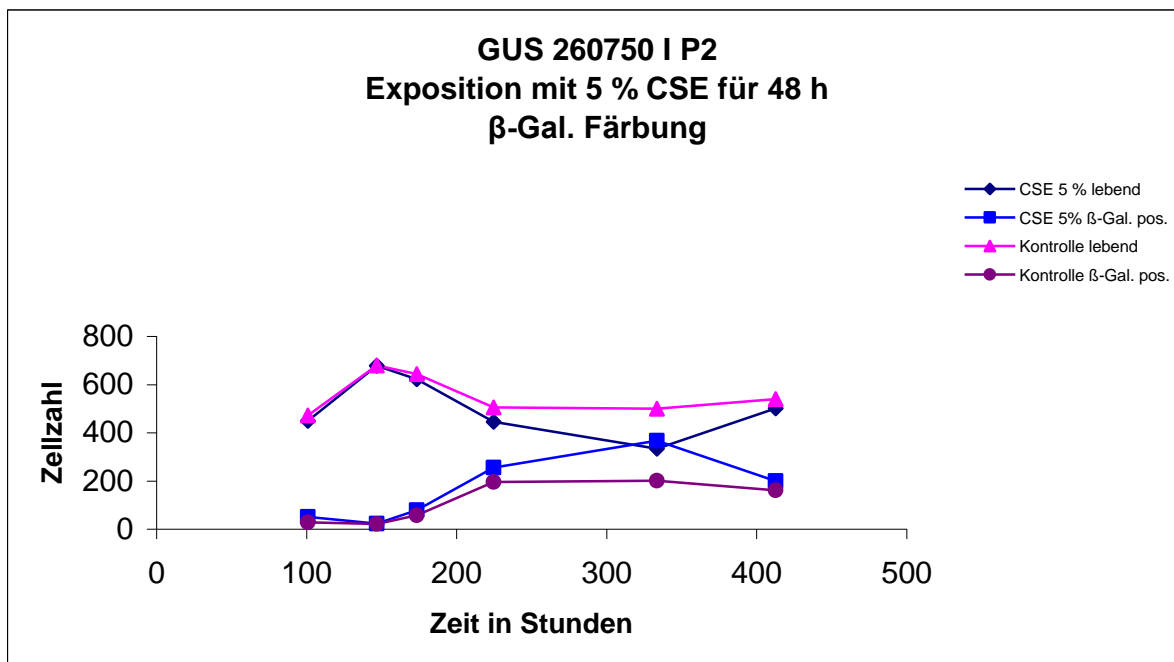


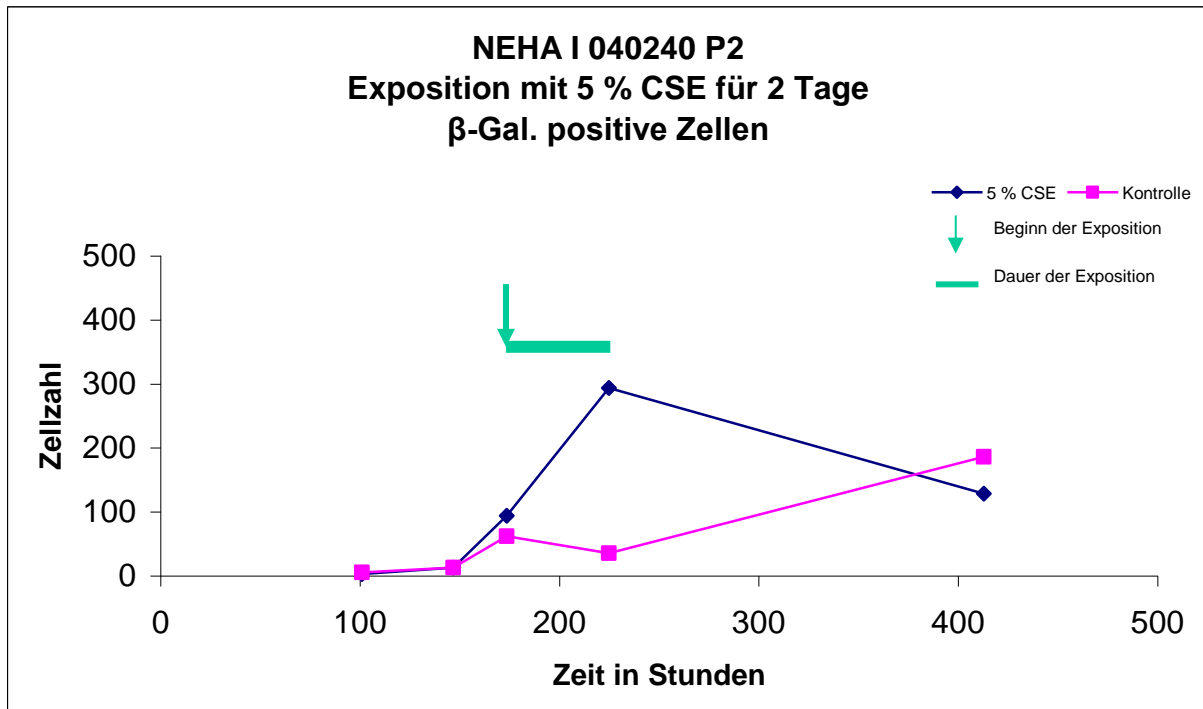
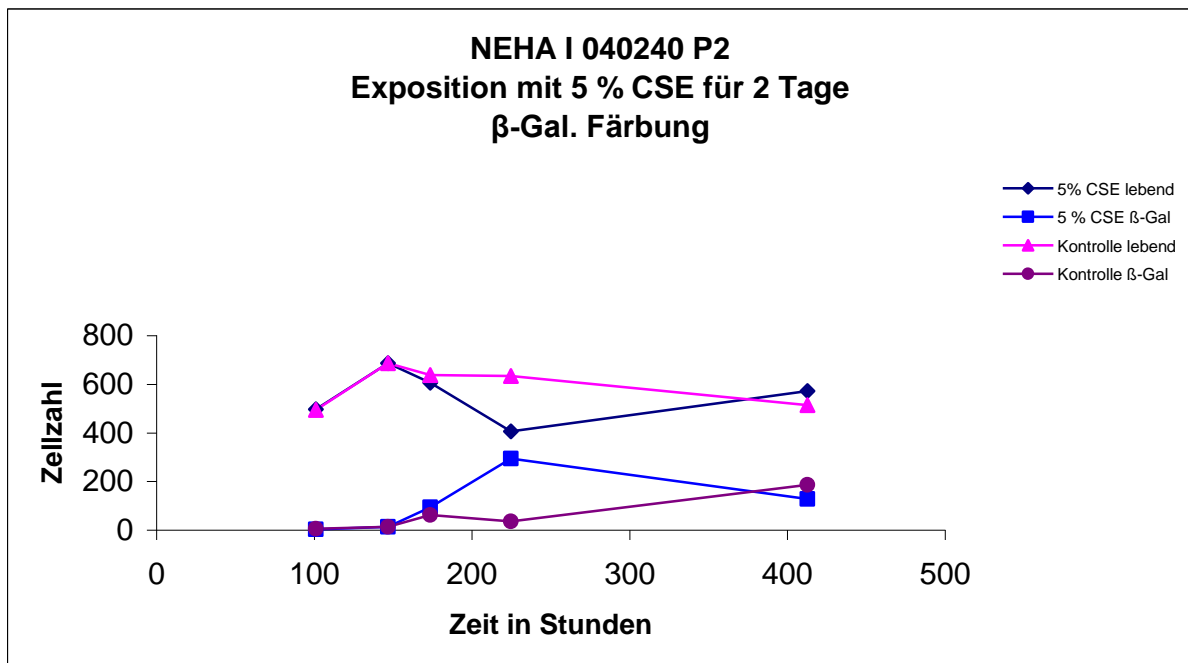


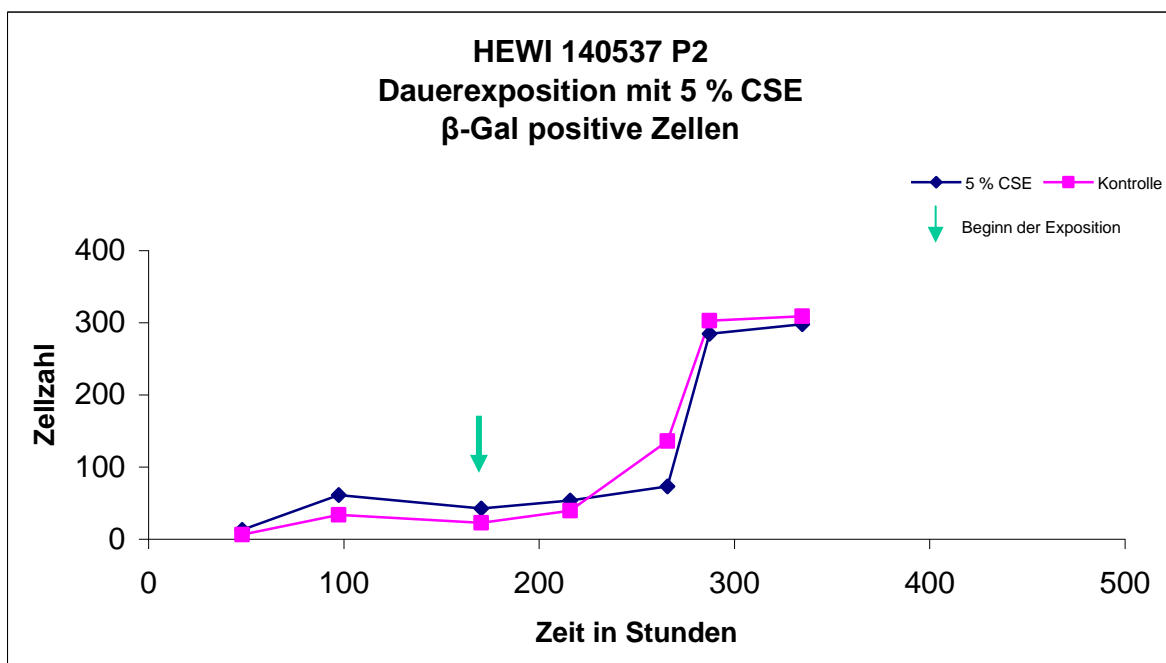
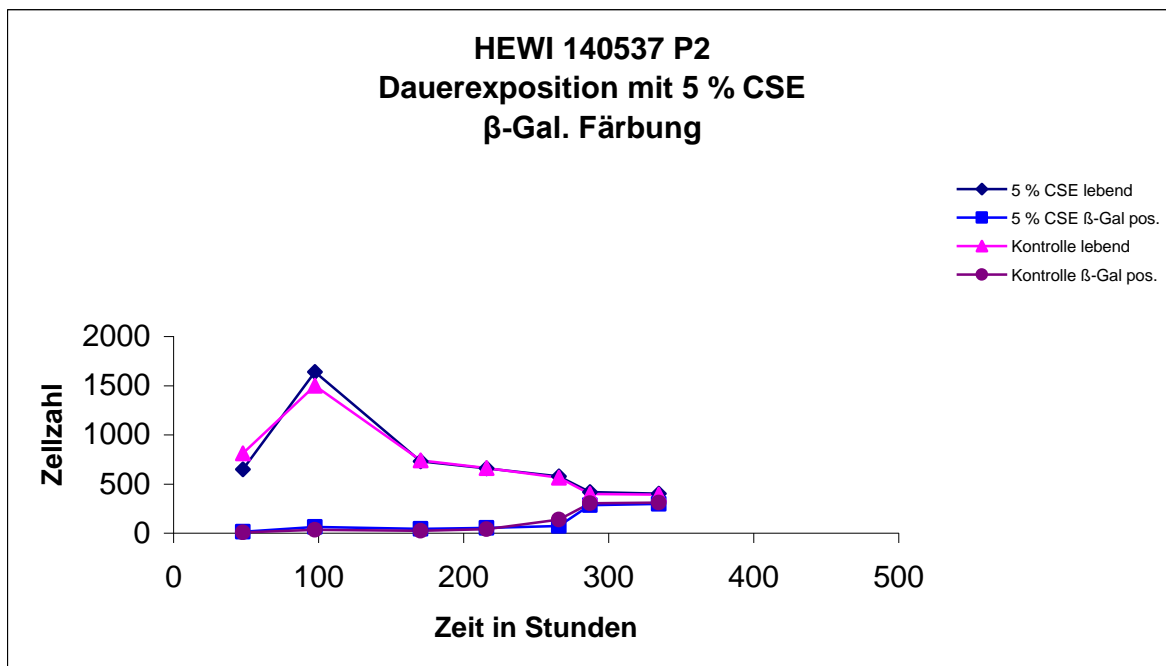












9. Literaturverzeichnis

- Absher M (1995). Fibroblasts. In: Lung cell biology. Lung biology in health and disease, ed. Massaro D. Marcel Dekker, New York, pp. 401-439.
- American Thoracic Society (2000). What constitutes an adverse health effect of air pollution? Official statement of the American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Medicine* 161:665-673.
- American Thoracic Society (2002). American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease. www.thoracic.org/sections/publications/statements/pages/eoh/burden1-11.html.
- Anderson JA, Dunnhill MS, Ryder RC (1972). Dependence of the incidence of emphysema on smoking history, age and sex. *Thorax* 27:547-551.
- Amsellem V, Gary-Bobo G, Marcos E, Maitre B, Chaar V, Validire P, Stern JB, Nouredine H, Sapin E, Rideau D, Hue S, Le Corvoisier P, Le Gouvello S, Dubois-Randé JL, Boczkowski J, Adnot S (2011) Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 184(12):1358-1366.
- Anthonisen NR, Connett JE, Murray RP (2002). Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years. *Am J Respir Crit Care Med* 166:675-679.
- Anzueto A (2006). Clinical course of chronic obstructive pulmonary disease: review of therapeutic interventions. *Am J Med* 119(10 Suppl 1):46-53.
- Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A (2003b). Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:555-562.
- Armanios M (2013). Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest* 123(3):996-1002.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495.
- Balin AK, Fisher AJ, Anzelone M, Leong I, Allen RG (2002). Effects of establishing cell cultures and cell culture conditions on the proliferative life span of human fibroblasts isolated from different tissues and donors of different ages. *Exp Cell Res* 274:275-287.
- Barnes PJ, Hansel TT (2004). Prospects for new drugs for chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 364:985-996.
- Barnes PJ, Celli BR (2009). Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 33(5):1165-1185.
- Bartal M (2005). COPD and tobacco smoke. *Monaldi Arch Chest Dis* 63:213-225.
- Bartling B (2013). Cellular senescence in normal and premature lung aging. *Z Gerontol Geriatr* 46(7):613-622.
- Beisswenger C, Platz J, Seifart C, Vogelmeier C, Bals R (2004). Exposure of differentiated airway epithelial cells to volatile smoke in vitro. *Respiration* 71:402-409.
- Bratic A, Larsson NG (2013). The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest* 123(3):951-957.
- Budweiser S, Heinemann F, Meyer K, Wild PJ, Pfeifer M (2006a). Weight gain in cachectic COPD patients receiving noninvasive positive-pressure ventilation. *Respir Care* 51:126-132.

- Calverley PM, Walker P (2003). Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 362:1053-1061.
- Cannard E, Kronseder A, Welker L, Holz O, Watz H, Branscheid D, Magnussen H, Nowak D, Jörres RA (2006). Repeated exposure to cigarette smoke extract (CSE) in primary human lung fibroblasts – effects on proliferation rate. *Eur Respir J* 28(Suppl 50):635s (abstract).
- Celli BR (2006). Chronic obstructive pulmonary disease: from unjustified nihilism to evidence-based optimism. *Proc Am Thorac Soc* 3:58-65.
- Chen Q, Ames BN (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4130-4134.
- Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, Ames BN (1998). Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J* 332:43-50.
- Chilosi M, Carloni A, Rossi A, Poletti V (2013). Premature lung aging and cellular senescence in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and COPD/emphysema. *Transl Res* 162(3):156-173.
- Cockcroft A, Seal RM, Wagner JC, Lyons JP, Ryder R, Andersson N (1982). Post-mortem study of emphysema in coalworkers and non-coalworkers. *Lancet* 2:600-603.
- Decramer M, Janssens W, Miravittles M (2012). Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 379(9823):1341-1351.
- De Ritis S (2009). Wirkung von Zigarettenrauchextrakt auf die Proliferation menschlicher Lungenfibroblasten. Beitrag von Nikotin und Oxidantien. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9363-9367.
- Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FL, Capelli A, Adcock IM, Donner CF (2004). Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin Exp Allergy* 34:1156-1167.
- Dodge R, Cline MG, Burrows B (1986). Comparisons of asthma, emphysema, and chronic bronchitis diagnoses in a general population sample. *Am Rev Respir Dis* 133:981-986.
- Fabbri LM, Beghé B, Agustí A (2012). COPD and the solar system: introducing the chronic obstructive pulmonary disease comorbidome. *Am J Respir Crit Care Med* 186(2):117-119.
- Famulski KS, Halloran PF (2005). Molecular events in kidney ageing. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14:243-248.
- Fletcher C, Peto R (1977). The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1:1645-1648.
- Freiman A, Bird G, Metelitsa AI, Barankin B, Lauzon GJ (2004). Cutaneous effects of smoking. *J Cutan Med Surg* 8:415-423.
- Fukuchi Y (2009). The aging lung and chronic obstructive pulmonary disease: Similarity and difference. *Proc Am Thorac Soc*. 6(7):570-572.

- Galbán CJ, Han MK, Boes JL, Chughtai KA, Meyer CR, Johnson TD, Galbán S, Rehemtulla A, Kazerooni EA, Martinez FJ, Ross BD (2012). Computed tomography-based biomarker provides unique signature for diagnosis of COPD phenotypes and disease progression. *Nat Med* 18(11):1711-1715.
- García-Olmos L, Alberquilla A, Ayala V, García-Sagredo P, Morales L, Carmona M, de Tena-Dávila MJ, Pascual M, Muñoz A, Salvador CH, Monteagudo JL (2013). Comorbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease in family practice: a cross sectional study. *BMC Fam Pract* 16;14:11.
- Gold DR, Wang X, Wypij D, Speizer FE, Ware JH, Dockery DW (1996). Effects of Cigarette Smoking on Lung Function in Adolescent Boys and Girls, *N Engl J Med* 335(13):931-937.
- GOLD (2013). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of chronic obstructive pulmonary disease Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2013—Zugänglich unter: <http://www.goldcopd.com>.
- Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM (2006). Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 28:523-532.
- Hall JA, Dominy JE, Lee Y, Puigserver P (2013). The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *J Clin Invest.* 123(3):973-979.
- Hayflick L (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37:614-636.
- Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621.
- Holz O, Zühlke I, Jaksztat E, Müller KC, Welker L, Nakashima M, Diemel KD, Branscheid D, Magnussen H, Jörres RA (2004). Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *Eur Respir J* 24:575-579.
- Ito K, Barnes PJ (2009). COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest* 135:173-180.
- Janssens JP, Pache JC, Nicod LP (1999). Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J* 13:197-205.
- Jinno S, Kida K and Ootsubo K (1994). Epidemiology of emphysema: analysis by autopsy in a series of elderly patients. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 32 Suppl:193-199.
- Jones OR, Scheuerlein A, Salguero-Gómez R, Camarda CG, Schaible R, CasperBB, Dahlgren JP, Ehrlén J, García MB, Menges ES, Quintana-Ascencio PF, Caswell H, Baudisch A, Vaupel JW (2014). Diversity of ageing across the tree of life. *Nature* 505(7482):169-173.
- Jörres, RA, Kronseder A, Uhlmann S, Holz O, Welker L, Hessel H, Branscheid D, Magnussen H, Nowak D (2005). Replicative senescence of lung fibroblasts after exposure to hydrogen peroxide or cigarette smoke extract. *Eur Respir J* 26(suppl 49):102s (abstract).
- Karrasch S, Holz O, Jörres RA (2008). Aging and induced senescence as factors in the pathogenesis of lung emphysema. *Respir Med* 102:1215-1230.
- Kasahara Y, Tudor RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF (2001). Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 163:737-744.

- Kim H, Liu X, Kohyama T, Kobayashi T, Conner H, Abe S, Fang Q, Wen FQ, Rennard SI (2004b). Cigarette smoke stimulates MMP-1 production by human lung fibroblasts through the ERK1/2 pathway. *COPD* 1:13-23.
- Kushner JA (2013). The role of aging upon β cell turnover. *J Clin Invest.* 123(3):990-995.
- Leung WC, Harvey I (2002). Is skin ageing in the elderly caused by sun exposure or smoking? *Br J Dermatol* 147:1187-1191.
- MacNee W (2005). Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2:258-266; discussion 290-291.
- MacNee W (2009). Accelerated lung aging: a novel pathogenic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Biochem Soc Trans*;37(Pt 4):819-823.
- Martey CA, Pollock SJ, Turner CK, O'Reilly KM, Bagloli CJ, Phipps RP, Sime PJ (2004). Cigarette smoke induces cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E2 synthase in human lung fibroblasts: implications for lung inflammation and cancer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L981-991.
- Massaro GD, Radaeva S, Clerch LB, Massaro D (2002). Lung alveoli: endogenous programmed destruction and regeneration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L305-309.
- Massaro D, Massaro GD, Baras A, Hoffman EP, Clerch LB (2004b). Calorie-related rapid onset of alveolar loss, regeneration, and changes in mouse lung gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L896-906. Erratum in: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L1349.
- Menni C, Kastenmüller G, Petersen AK, Bell JT, Psatha M, Tsai PC, Gieger C, Schulz H, Erte I, John S, Brosnan MJ, Wilson SG, Tsaprouni L, Lim EM, Stuckey B, Deloukas P, Mohnen R, Suhre K, Spector TD, Valdes AM (2013). Metabolomic markers reveal novel pathways of ageing and early development in human populations. *Int J Epidemiol* 42(4):1111-1119.
- Miravittles M, Soler-Cataluña JJ, Calle M, Soriano JB (2013). Treatment of COPD by clinical phenotypes: putting old evidence into clinical practice. *Eur Respir J.* 41(6):1252-1256.
- Montecino-Rodriguez E, Berent-Maoz B, Dorshkind K (2013). Causes, consequences and reversal of immune system aging. *J Clin Invest* 123(3):958-965.
- Müller KC, Paasch K, Feindt B, Welker L, Watz H, Branscheid D, Nakashima M, Magnussen H, Jörres RA, Holz O (2006a). Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem und Kontrollen unterscheiden sich in der Proliferation nach Inkubation mit Insulin, IGF-1 und IGF-2. *Herbsttagung der Arbeitsgruppe Zellbiologie der DGP, Mainz, 2./4. 11. 2006.*
- Müller KC, Welker L, Paasch K, Feindt B, Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Krug N, Nakashima M, Branscheid D, Magnussen H, Jörres RA, Holz O (2006b). Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. *Respir Res* 7:32.
- Nagai A, Thurlbeck WM (1991). Scanning electron microscopic observations of emphysema in humans. A descriptive study. *Am Rev Respir Dis* 144:901-908.
- Nakajima C, Kijimoto C, Yokoyama Y, Miyakawa T, Tsuchiya Y, Kuroda T, Nakano M, Saeki M (1998). Longitudinal follow-up of pulmonary function after lobectomy in childhood - factors affecting lung growth. *Pediatr Surg Int* 13:341-345.

- Newgard CB, Sharpless NE (2013). Coming of age: molecular drivers of aging and therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 123(3):946-950.
- Ning W, Dong Y, Sun J, Li C, Matthay MA, Feghali-Bostwick CA, Choi AM (2006). Cigarette Smoke Stimulates Matrix Metalloproteinase-2 Activity via EGR-1 in Human Lung Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(4):480-490.
- Nobukuni S, Watanabe K, Inoue J, Wen FQ, Tamaru N, Yoshida M (2002). Cigarette smoke inhibits the growth of lung fibroblasts from patients with pulmonary emphysema. *Respirology* 7:217-223.
- Noordhoek JA, Postma DS, Chong LL, Vos JT, Kauffman HF, Timens W, van Straaten JF (2003). Different proliferative capacity of lung fibroblasts obtained from control subjects and patients with emphysema. *Exp Lung Res* 29:291-302.
- Nowak D, Berger K, Lippert B, Kilgert K, Caesar M, Sandtmann R (2005). Epidemiology and health economics of COPD across Europe: a critical analysis. *Treat Respir Med* 4:381-395.
- Nyunoya T, Monick MM, Klingelhutz A, Yarovinsky TO, Cagley JR, Hunninghake GW (2006). Cigarette smoke induces cellular senescence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:681-688.
- Ogryzko VV, Hirai TH, Russanova VR, Barbie DA, Howard BH (1996a). Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol Cell Biol* 16:5210-5218.
- Paschalaki KE, Starke RD, Hu Y, Mercado N, Margariti A, Gorgoulis VG, Randi AM, Parnes PJ (2013) Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and COPD patients due to increased DNA damage and senescence. *Stem Cells*. doi: 10.1002/stem.1488. [Epub ahead of print]
- Pauwels RA, Rabe KF (2004). Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet* 364:613-620.
- Prescott E, Lange P, Vestbo J (1999). Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J* 13: 1109-1114.
- Rodgman A, Smith CJ, Perfetti TA (2000). The composition of cigarette smoke: a retrospective, with emphasis on polycyclic components. *Hum Exp Toxicol* 19:573-595.
- Rubin H. (1997) Cell aging in vivo and in vitro. *Mech Ageing Dev* 98(1):1-35.
- Sato M, Ishikawa Y, Takahashi Y, Itoh T, Minami Y, Nakamura M (2008). Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 198(2):347-353.
- Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, Maitre B, Sarni M, Housset B, Weitzenblum E, Matrat M, Le Corvoisier P, Rideau D, Boczkowski J, Dubois-Randé JL, Chouaid C, Adnot S (2009). Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 179(7):566-571.
- Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ (2000). Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res* 257:162-171.
- Snider GL (1989). Chronic obstructive pulmonary disease: risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Annu Rev Med* 40:411-429.

- Tchkonia T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 123(3):966-972.
- Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A (2004). Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:643-649.
- Tuder RM, Petrache I, Elias JA, Voelkel NF, Henson PM (2003). Apoptosis and emphysema: the missing link. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:551-554.
- Vaupel JW (2010). Biodemography of human ageing. *Nature*. 464(7288):536-542.
- Verbeken EK, Cauberghs M, Mertens I, Clement J, Lauweryns JM, Van de Woestijne KP (1992). The senile lung. Comparison with normal and emphysematous lungs. 1. Structural aspects. *Chest* 101:793-799.
- Volonte D, Kahkonen B, Shapiro S, Di Y, Galbiati F (2009). Caveolin-1 expression is required for the development of pulmonary emphysema through activation of the ATM-p53-p21 pathway. *J Biol Chem* 284(9):5462-5466.
- Weibel ER, Gehr P, Haies D, Gil J, Bachofen M (1976). The cell population of the normal lung. In *Lung cells in disease*. Ed. Bouhuys A, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 3-16.
- West JB (1987). *Pulmonary Pathophysiology*. 3.ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1987.
- WHO: Report of an expert committee: Definition and diagnosis of pulmonary disease with special reference to chronic bronchitis and emphysema. WHO Techn Rep Ser 1961; 213: 14-19.
- WHO (2004) The Global Burden of Disease update 2004, published in 2008 http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html
- WHO (2013) World Health Statistics, Cause specific mortality Estimates for 2000 – 2011 und chronic obstructive pulmonary disease http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GHE_DthGlobal_2000_2011.xls <http://www.who.int/respiratory/copd/en/>
- Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Timens W, Postma DS (2004). Smoking cessation improves both direct and indirect airway hyperresponsiveness in COPD. *Eur Respir J* 24:391-396.
- Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Postma DS, Timens W (2005). Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J* 26:835-845.
- Zink D, Fischer AH, Nickerson JA (2004). Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 4:677-687.

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildungen	Seite
Abbildung 1: Apparatur zum Abrauchen der Zigaretten in D-MEM	19
Abbildung 2: Anfärbung der β -Galaktosidase-positiven Zellen mit Hämalaun-Lösung	24
Abbildung 3: Aufteilung der Wells einer TC24-Well-Platte	25
Abbildung 4: Belegung einer TC24-Well-Platte mit drei Spendern	27
Abbildung 5: Beispiel einer Proliferationskurve einer temporären Exposition von Lungenfibroblasten mit 10 μ M H ₂ O ₂ über 2h	30
Abbildung 6: Beispiel einer Proliferationskurve einer temporären Exposition von Lungenfibroblasten mit 50 μ M H ₂ O ₂ über 2h	30
Abbildung 7: Mittelwerte und Standardfehler aller Zellen bei einer dauerhaften Exposition der Lungenfibroblasten mit 1% CSE	32
Abbildung 8: Mittelwerte und Standardfehler der vitalen Zellen bei einer dauerhaften Exposition der Lungenfibroblasten mit 1 % CSE	32
Abbildung 9: Mittelwerte und Standardfehler der nicht vitalen Zellen bei einer dauerhaften Exposition der Lungenfibroblasten mit 1 % CSE	33
Abbildung 10: Mittelwerte und Standardfehler aller Zellen bei einer dauerhaften Exposition der Lungenfibroblasten mit 2% CSE	33
Abbildung 11: Mittelwerte und Standardfehler der vitalen Zellen bei einer dauerhaften Exposition der Lungenfibroblasten mit 2 % CSE	34
Abbildung 12: Mittelwerte und Standardfehler der nicht vitalen Zellen bei einer dauerhaften Exposition der Lungenfibroblasten mit 2 % CSE	34
Abbildung 13: Mittelwerte und Standardfehler aller Zellen bei einer dauerhaften Exposition der Lungenfibroblasten mit 5% CSE	35

Abbildung 14: Mittelwerte und Standardfehler der vitalen Zellen bei einer dauerhaften Exposition der Lungenfibroblasten mit 5 % CSE	35
Abbildung 15: Mittelwerte und Standardfehler der nicht vitalen Zellen bei einer dauerhaften Exposition der Lungenfibroblasten mit 5 % CSE	36
Abbildung 16: Mittelwerte und Standardfehler aller Zellen bei einer temporären Exposition der Lungenfibroblasten mit 5% CSE für 2 Tage	37
Abbildung 17: Mittelwerte und Standardfehler der vitalen Zellen bei einer temporären Exposition der Lungenfibroblasten mit 5 % CSE für 48 h	38
Abbildung 18: Mittelwerte und Standardfehler der nicht vitalen Zellen bei einer temporären Exposition der Lungenfibroblasten mit 5 % CSE für 48 h	38
Abbildung 19: Für β -Galaktosidase positiv gefärbte Zellen nach Natriumbutyrat Gabe	39
Abbildung 20: Für β -Galaktosidase positiv gefärbte Zellen nach Exposition mit 5 % CSE für 48 h	40
Abbildung 21: Reduzierte Proliferationsrate von Lungenfibroblasten bei Patienten mit Emphysem gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe [Holz et al 2004]	42

11. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse
BrdU	Bromdesoxiuridin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CSE	Cigarette smoke extract
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h	Stunde
HFL-1	Humane fetale Lungenfibroblasten (Zelllinie)
IGF 1 & 2	Insulin-like growth factor 1 & 2
IL-1 β	Interleukin 1- β
LDH	Laktatdehydrogenase
Na-Butyrat	Natriumbutyrat
p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor am Genlocus <i>INK4a</i>
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor am Genlocus <i>CIP1/WAF1/Sdi1</i>
p38	mitogen-activated protein kinase
p53	Tumorsuppressorprotein vom Molekulargewicht 53 kDa
p	Signifikanzniveau (Fehler erster Art)
PBS	Phosphate-buffered saline
pH	pondus Hydrogenii
Rb	Retinoblastoma-Protein
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase
SAHF	Seneszenz-assoziierte heterochromatische Foci
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)

TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
TSA	Trichostatin A
t-Test	parametrischer Hypothesentest
WHO	World Health Organisation

Anhang

A.1. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. Jörres für die geduldige und unermüdliche Unterstützung bedanken. Ohne seine Ruhe, seine unglaubliche Geduld und sein enormes Fachwissen wäre diese Arbeit sicher nicht zustande gekommen.

Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Dennis Nowak für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut und der Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München durchzuführen.

Des Weiteren danke ich Frau Angelika Kronseder, die mir in vielen, vielen Stunden bei der Durchführung der Versuche geholfen hat und mich in die doch nicht so langweilige Laborarbeit eingeführt hat. Sie ist mir bei jedem Problem immer freundlich und tatkräftig zur Seite gestanden und stand mir auch nach der Laborarbeit mit vielen Tipps bei der Auswertung der Daten zur Seite.

Mein weiterer Dank geht an meinen Mann Markus Schindler, meine Eltern und meine Schwester, die an vielen Wochenenden und Abenden auf mich verzichten mussten, da die Zellen versorgt und gezählt werden mussten. Außerdem schenkten sie mir in der Zeit der Fertigstellung erneut viele Wochenenden, an denen sie die Kinder beschäftigten, damit ich in Ruhe arbeiten konnte und ermutigten mich in Zeiten mit geringer Motivation nicht aufzugeben. So ist diese Arbeit auch trotz einiger ungeplanter Ereignisse in meinem Leben und der Geburt unserer zwei tollen Kinder noch zu einem glücklichen Ende gekommen.

A.2. Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Wirkung von Zigarettenrauchextrakt und Wasserstoffperoxid auf das Wachstumsverhalten menschlicher Lungenfibroblasten

Selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort/Datum

Sabine Schindler, Doktorandin